

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES

PAR

MARIE-CLAUDE SAUVÉ

L'ANALYSE DU MODE D'ACTION DE LA CHAPERONNE DnaK  
SUR UNE PROTÉINE ENTIÈRE MONTRE UNE ACTIVITÉ DE TYPE  
« HOLDASE »

FÉVRIER 2007

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## AVANT-PROPOS

Si les obstacles de la vie nous étaient présentés intégralement avant de se retrouver à la distance d'un miroir de notre visage, l'humanité reculerait sans doute plus rapidement qu'elle n'avance présentement. C'est dans l'insouciance que j'ai entamé ces études, et c'est dans cette même insouciance que je passerai à une autre étape. Celui qui apprend de sa naïveté la perd, mais celui qui sait s'en servir pour avancer n'y perdra rien. Bref, fonçons.

Je remercie d'abord mon directeur de maîtrise François Boucher, pour qui rien n'est impossible quand on y met un peu de bonne volonté, qui a su être disponible et me guider dans mes études de premier et de deuxième cycle. Je le remercie pour l'altruisme dont il fait preuve en ne cherchant qu'à offrir la meilleure formation possible.

Merci à Arturo Muga, de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Espagne, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire pour le temps de la réalisation des expériences nécessaires à la rédaction de ce mémoire. À Stefka G. Taneva, directrice du stage en Espagne, merci beaucoup pour son aide et pour sa prévenance, son intégrité et pour l'expertise scientifique.

Je remercie de tout cœur tous les autres membres de l'équipe du laboratoire des chaperonnes à la UPV à Bilbao en Espagne pour les discussions scientifiques pertinentes. C'est grâce à leur soutien moral, technique, linguistique et aux soirées espagnoles passées en leur compagnie que ce séjour dans leur pays a été aussi enrichissant. Merci aussi à la CRÉPUQ qui a financé une partie de ce voyage.

Je termine en remerciant ma famille et mes amis, qui appuient sans réserve les efforts que requièrent les nombreuses années d'études scientifiques.

# RÉSUMÉ

Les protéines sont de longues chaînes d'acides aminés qui doivent se positionner de façon très précise pour accomplir leur fonction. Pour les assister dans leur repliement, la cellule dispose de chaperonnes moléculaires. Il existe plusieurs familles de chaperonnes, presque toutes composées de protéines de choc thermique, qui coopèrent entre elles par la combinaison de leur fonctions spécifiques et la reconnaissance de substrats.

La représentante bactérienne de la famille des protéines de choc thermique de 70kDa, DnaK, réalise sa fonction de chaperonne sur les polypeptides en élongation, lors de chocs thermiques et pour assurer le transfert de substrats entre les familles de chaperonnes. Il est probable que plusieurs mécanismes soient employés par DnaK pour agir sur les protéines. Il a été proposé que les rôles de protection des polypeptides et de leur conservation à l'état déplié soient régulés par un mécanisme de « holdase ». Cette théorie préconise que plusieurs molécules de DnaK se lient à un seul polypeptide, engendrant un encombrement stérique empêchant le substrat de se replier incorrectement. L'objectif de mon étude était de vérifier l'existence d'un tel mode d'action sur un modèle polypeptidique mimant une protéine dénaturée, la lactalbumine réduite et carboxyméthylée.

Pour appuyer cette théorie, on procédera d'abord à la vérification de l'existence d'un complexe formé des deux protéines ; la chaperonne et son substrat. Par la suite, en utilisant l'anisotropie de fluorescence, on vérifiera la spécificité de la liaison en se basant sur le comportement de DnaK en présence de nucléotides. C'est avec cette même technique que la constante de dissociation du complexe sera révélée par un titrage de DnaK avec une quantité de lactalbumine invariable. La caractérisation de la stabilité de la liaison et de sa dissociation est essentielle à la fois à la réalisation des expériences et à la vérification de la théorie de « holdase ».

Par la suite, on pourra entamer les mesures calorimétriques qui serviront à décrire le système du point de vue thermodynamique et à déterminer le nombre de sites de liaison de DnaK sur la lactalbumine. Un titrage calorimétrique isotherme fournira ces informations. C'est sur la base du nombre de sites de liaison qu'un protocole utilisant des gels de polyacrylamide et la spectroscopie de masse sera élaboré. Cette expérience permettra d'identifier les sites de liaison de DnaK sur la lactalbumine, dans le but de comparer nos résultats avec les valeurs d'affinité déjà publiées pour la chaperonne et ses substrats. C'est avec tous ces éléments qu'on pourra conclure que DnaK agit en « holdase » sur la lactalbumine mimant le polypeptide déplié.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>AVANT-PROPOS.....</b>	<b>ii</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>iii</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTE DES SYMBOLES ET ABBRÉVIATIONS.....</b>	<b>xi</b>
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
1.1    Chaperonnes moléculaires et repliement protéique .....	1
1.1.1    La structure tridimensionnelle des protéines.....	2
1.1.2    Repliement protéique spontané et assisté.....	5
1.1.3    Les différentes familles de chaperonnes .....	5
1.1.4    Interactions entre familles de chaperonnes .....	8
1.1.5    Aspects cellulaires des chaperonnes .....	10
1.2    Protéines Hsp70 .....	11
1.2.1    Fonctions des Hsp70s.....	11
1.2.2    Structure des Hsp70s.....	13
1.2.3    Cycle fonctionnel de Hsp70 .....	14
1.3    DnaK de <i>E. coli</i> , Hsp70 bactérien .....	15
1.3.1    Structure de DnaK.....	16
1.3.2    Cycle fonctionnel et cofacteurs de DnaK.....	17
1.4    Substrats protéiques de DnaK .....	19
1.4.1    Caractéristiques physiques du site de liaison du substrat sur DnaK	20
1.4.2    L'étude de l'affinité des peptides pour DnaK .....	20
1.4.3    Les motifs recherchés par DnaK .....	21
1.4.4    Les substrats naturels de DnaK .....	23
1.4.5    La lactalbumine est reconnue comme un substrat par DnaK.....	24
1.5    Modèles de mode d'action de DnaK et objectifs du travail .....	25
1.5.1    Repliement assisté par DnaK et ses cofacteurs .....	25

1.5.2	Modèle d'action de DnaK dit de «holdase » .....	28
1.5.3	Objectifs de la recherche.....	29
<b>CHAPITRE 2 : MÉTHODES EXPÉRIMENTALES.....</b>		<b>32</b>
2.1	Techniques de préparation des échantillons.....	32
2.1.1	Préparation du plasmide et de cellules compétentes de <i>E. coli</i> .....	32
2.1.2	Insertion du plasmide dans les cellules compétentes par électroporation.....	33
2.1.3	Culture bactérienne de <i>E. coli</i> .....	34
2.1.4	Purification de DnaK.....	34
2.1.5	Marquage de la RCMLA par le fluorophore FITC .....	38
2.1.6	Mesures de concentration protéique.....	39
2.2	Électrophorèses de protéines.....	41
2.2.1	Gel de SDS de 12,5% d'acrylamide.....	41
2.2.2	Gel de Tris-tricine à 16,5% d'acrylamide .....	42
2.2.3	Gel en gradient d'acrylamide .....	42
2.2.4	Gels natifs.....	43
2.2.5	Révélation des bandes sur le gel .....	43
2.3	Appareils et mesures biophysiques .....	45
2.3.1	Anisotropie de fluorescence .....	45
2.3.2	Chromatographies d'exclusion de taille.....	47
2.3.3	Titration calorimétrique isotherme (ITC).....	49
2.3.4	Spectroscopie de masse.....	52
<b>CHAPITRE 3 : RÉSULTATS.....</b>		<b>56</b>
3.1	Détermination des conditions de formation de complexe et spécificité .....	56
3.1.1	Effet de la température sur la liaison de DnaK au substrat.....	57
3.1.2	Effet de la présence de potassium dans le tampon.....	57
3.1.3	Temps d'incubation nécessaire à l'équilibre enzymatique .....	58
3.1.4	Spécificité de l'interaction entre RCMLA et DnaK.....	59
3.2	Stabilité et dynamique de dissociation du complexe .....	61
3.2.1	Stabilité du complexe en temps réel.....	61

3.2.2	Détermination de la constante de dissociation par anisotropie de fluorescence.....	63
3.3	Optimisation de la formation du complexe de DnaK et de RCMLA.....	65
3.3.1	Utilisation d'agents pontants (crosslinkers) pour la révélation du complexe par SDS-PAGE.....	66
3.3.2	Les gels natifs pour l'optimisation du ratio de DnaK et de RCMLA.....	68
3.3.3	Caractérisation des complexes par chromatographie d'exclusion ...	69
3.4	Calorimétrie, thermodynamique et détermination du nombre de sites de liaison .....	70
3.4.1	Thermodynamique de liaison de DnaK à RCMLA en ITC à 37°C .	72
3.4.2	Thermodynamique de liaison de DnaK à RCMLA en ITC à 42°C .	74
3.5	Identification des fragments de RCMLA contenant les sites de liaison à DnaK .....	76
3.5.1	Conditions de digestion partielle du complexe par la trypsine .....	76
3.5.2	Gel de digestion du complexe RCMLA/DnaK par la trypsine .....	78
3.5.3	Identification des fragments de RCMLA contenant les sites de liaison de DnaK par spectroscopie de masse. ....	81
<b>CHAPITRE 4 : INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS .....</b>		<b>85</b>
4.1	Interprétation de la caractérisation du complexe et de sa stabilité.....	85
4.2	Complexes à différents ratios protéiques initiaux.....	87
4.3	Les données thermodynamiques et leur signification .....	88
4.4	L'identification des sites de liaison.....	90
4.5	Perspectives de recherche .....	90
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>		<b>93</b>



## **LISTE DES TABLEAUX**

<b>1.1 :</b>	Résumé des principales chaperonnes et de leur fonction.....	7
<b>4.1 :</b>	Résumé des données thermodynamiques.....	89

## LISTE DES FIGURES

<b>1.1 :</b>	Organisation structurelle des protéines. ....	3
<b>1.2 :</b>	Processus de repliement spontané des protéines. ....	6
<b>1.3 :</b>	Transfert de substrat entre les familles de chaperonnes. ....	9
<b>1.4 :</b>	Le rôle cellulaire des Hsp70s est diversifié. ....	12
<b>1.5 :</b>	Représentation en rubans de Hsc70 bovine (PDB : 1YUW). ....	14
<b>1.6 :</b>	Modulation de la conformation des Hsp70s par les nucléotides. ....	16
<b>1.7 :</b>	Structure des domaines de liaison au substrat et ATPase de DnaK. ....	18
<b>1.8 :</b>	Représentation du SBD de DnaK (PDB : 1DKX) montrant l'hydrophobicité des régions .....	22
<b>1.9 :</b>	L'analyse de nombreuses séquences peptidiques indique le motif recherché par DnaK. ....	22
<b>1.10 :</b>	Structure de la $\alpha$ -lactalbumine bovine (PDB : 1A4V) et carboxyméthylation des cystéines. ....	26
<b>1.11 :</b>	Repliement assisté par DnaK et ses co-chaperonnes (modèle de Landry et al.) .....	29
<b>1.12 :</b>	Modèle de l'action de « holdase » de DnaK. ....	29
<b>2.1 :</b>	Réactions permettant de mesurer l'activité du domaine ATPase de DnaK. ....	37
<b>2.2 :</b>	Schéma du montage permettant de former un gradient d'acrylamide. ...	44
<b>2.3 :</b>	La RCMLA marquée perd de la liberté de mouvement lorsque liée à DnaK. ....	46
<b>2.4 :</b>	Schéma simplifié du trajet lumineux suivi dans un spectrofluorimètre mesurant l'anisotropie. ....	48
<b>2.5 :</b>	Schéma du dispositif d'injection dans la cellule de l'échantillon à l'intérieur d'un calorimètre ITC. ....	51
<b>2.6 :</b>	Schéma décrivant les différentes étapes suivies par l'échantillon en spectroscopie de masse. ....	54
<b>3.1 :</b>	Anisotropie de fluorescence mesurée à différentes températures. ....	58

<b>3.2 :</b>	Chromatogrammes résultants de l'injection de RCMLA avec DnaK dans un tampon contenant du KCl ou du NaCl. ....	59
<b>3.3 :</b>	Modulation de l'anisotropie de fluorescence par l'action de nucléotides. ....	60
<b>3.4 :</b>	Comparaison des quantités relatives de DnaK et RCMLA liés et libres après isolation du complexe. ....	62
<b>3.5 :</b>	Titration de FITC-RCMLA par DnaK, suivi par anisotropie de fluorescence. ....	64
<b>3.6 :</b>	Graphique en doubles réciproques (Lineweaver-Burk) du titrage de DnaK sur FITC-RCMLA. ....	65
<b>3.7 :</b>	Gel d'électrophorèse sur gradient de polyacrylamide montrant le complexe formé par FITC-RCMLA et DnaK en présence d'agents pontants. ....	67
<b>3.8 :</b>	Gel de polyacrylamide natif présentant différentes concentrations de DnaK à une quantité de RCMLA constante. ....	69
<b>3.9 :</b>	Chromatogrammes du complexe RCMLA-DnaK formé à différents ratios et révélés par l'absorbance à 290nm et à 494nm. ....	71
<b>3.10 :</b>	Titration calorimétrique isotherme de l'interaction de RCMLA avec DnaK à 37°C. ....	73
<b>3.11 :</b>	Titration calorimétrique isotherme de l'interaction de RCMLA avec DnaK à 42°C. ....	75
<b>3.12 :</b>	Gels préliminaires présentant les conditions adéquates de digestion partielle du complexe RCMLA-DnaK. ....	77
<b>3.14 :</b>	Gel (Tris-tricine, à 16,5% de polyacrylamide) de digestion par la trypsine du complexe RCMLA/DnaK révélé par coloration à l'argent. .	80
<b>3.15 :</b>	Identification par spectroscopie de masse des fragments de RCMLA contenant un site d'union à DnaK. ....	82

## LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

<b>A :</b>	absorbance
<b>ADN :</b>	acide désoxyribonucléique
<b>ADNc :</b>	ADN complémentaire
<b>ADP :</b>	adénosine diphosphate
<b>APS :</b>	persulfate d'ammonium
<b>ARN :</b>	acide ribonucléique
<b>ATP :</b>	adénosine triphosphate
<b>BS<sup>3</sup> :</b>	bis-(sulfosuccinimidyl)-suberate
<b>BSA :</b>	albumine de sérum bovine
<b>CHCA :</b>	solution d'acétonitrile et de TFA
<b><math>\Delta C_p</math> :</b>	différence de capacité calorifique à pression constante
<b><math>\Delta G</math> :</b>	différence d'énergie libre de Gibbs
<b><math>\Delta H</math> :</b>	différence d'enthalpie
<b>DMSO :</b>	diméthyl sulfoxyde
<b><math>\Delta S</math> :</b>	différence d'entropie
<b>DTT :</b>	dithiothréitol
<b><math>\epsilon</math> :</b>	coefficient d'absorption molaire
<b>EDTA :</b>	acide éthylène diamine tétraacétique
<b>FITC :</b>	isothiocyanate de fluorescéine
<b>HEPES :</b>	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazine-éthane-sulfonique
<b>HPLC :</b>	chromatographie liquide à haute pression
<b>Hsp :</b>	protéine de choc thermique
<b>Hsc :</b>	protéine de choc constitutive
<b>I :</b>	intensité
<b>IPTG :</b>	isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
<b>ITC :</b>	titrage calorimétrique isotherme
<b>K<sub>cat</sub> :</b>	constante catalytique
<b>K<sub>d</sub> :</b>	constante de dissociation

<b>LB :</b>	milieu de culture Luria-Bertani
<b>LDH :</b>	lactate deshydrogénase
<b>MALDI :</b>	matrice de désorption assistée par ionisation laser
<b>MW :</b>	masse moléculaire
<b>n :</b>	nombre de sites
<b>NAD :</b>	nicotinamide adénine dinucléotide
<b>NADH :</b>	forme réduite du NAD
<b>nR :</b>	peptide NRLLLTG
<b>PCR :</b>	réaction en chaîne de la polymérase
<b>PDB :</b>	banque de données des protéines (Protein Data Bank)
<b>PDI :</b>	protéine disulfure isomérase
<b>PEP :</b>	phosphoénol pyruvate
<b>PIPES :</b>	acide piperazine-N,N'-bis(2-éthanesulfonique)
<b>PK :</b>	pyruvate kinase
<b>PMSF :</b>	fluorure de phényl-méthane-sulphonyl
<b>r :</b>	anisotropie
<b>RCMLA :</b>	lactalbumine réduite et carboxy-méthylée
<b>RMN :</b>	résonance magnétique nucléaire
<b>RNase :</b>	ribonucléase
<b>RPM :</b>	rotation par minute
<b>SBD :</b>	domaine de liaison au substrat
<b>SDS :</b>	sodium dodécylsulfate
<b>SDS-PAGE :</b>	électrophorèse en gel de polyacrylamide avec SDS
<b>TCA :</b>	acide trichloroacétique
<b>TCEP :</b>	hydrochlorure de Tris (2-carboxyethyl) phosphine
<b>TEMED :</b>	tetraméthyl-éthylène-diamine
<b>TFA :</b>	acide trifluoroacétique
<b>TOF :</b>	temps de vol
<b>TRIS :</b>	trishydroxyméthyl-aminométhane
<b>u.a.:</b>	unités arbitraires
<b>UV:</b>	ultraviolet

# **CHAPITRE 1 :**

## **INTRODUCTION**

### **1.1 Chaperonnes moléculaires et repliement protéique**

La cellule est un univers stable et très organisé. Néanmoins, les conditions y sont parfois difficiles pour les protéines souvent fragiles qui exécutent la majorité des fonctions cellulaires. Entre autres, la densité protéique dans le cytoplasme est énorme (350-400 mg/ml) (1) et une telle concentration a pour conséquences une grande viscosité dans le milieu (2, 3) et un encombrement stérique pour les polypeptides naissants (1, 4). Il est ardu d'y prendre sa place, et l'environnement cellulaire particulier ne permet pas toujours aux protéines naissantes d'adopter leur conformation active.

L'effet est amplifié par le processus en sens unique de la traduction, côté N-terminal vers C-terminal, qui force les protéines à replier les régions du côté aminoterminal à mesure qu'elles sont exposées. L'arrivée d'acides aminés hydrophobes dans un cytosol polaire peut conduire à un enroulement de forme erronée ou à l'agrégation des protéines entre elles. D'une façon semblable, des situations de stress comme la hausse de température, de pH ou de force ionique contribuent également à déstabiliser la structure des protéines matures (5). De plus, certains événements physiologiquement importants comme le passage à travers des membranes des organelles et l'activation enzymatique requièrent des changements de conformation des protéines.

Un système sophistiqué permet aux protéines qui ne sont pas en conformation native de ne pas s'agréger et de retrouver leur forme fonctionnelle. Si certaines protéines peuvent amorcer le processus de repliement seules, d'autres nécessitent la présence des chaperonnes moléculaires, dont la fonction est d'assister certaines protéines dans leur transformation, tout en évitant l'agrégation (6). Le mystère n'est que

partiellement dévoilé quant à la stratégie utilisée par les chaperonnes moléculaires pour reconnaître et replier une grande variété de protéines.

Le terme « chaperonne moléculaire » a d'abord été utilisé pour décrire le comportement de la nucléoplasmine, une protéine du noyau nécessaire à l'assemblage des nucléosomes formés d'histones et d'ADN, dans des extraits d'œufs de *Xenopus* (7), et agit donc en se liant aux acides nucléiques. Nommée ainsi en référence au terme français désignant la femme autrefois chargée de veiller sur une jeune fille, le terme moléculaire a été élargi aux protéines dont la tâche, similairement à la nucléoplasmine, se concentre sur les polypeptides (8).

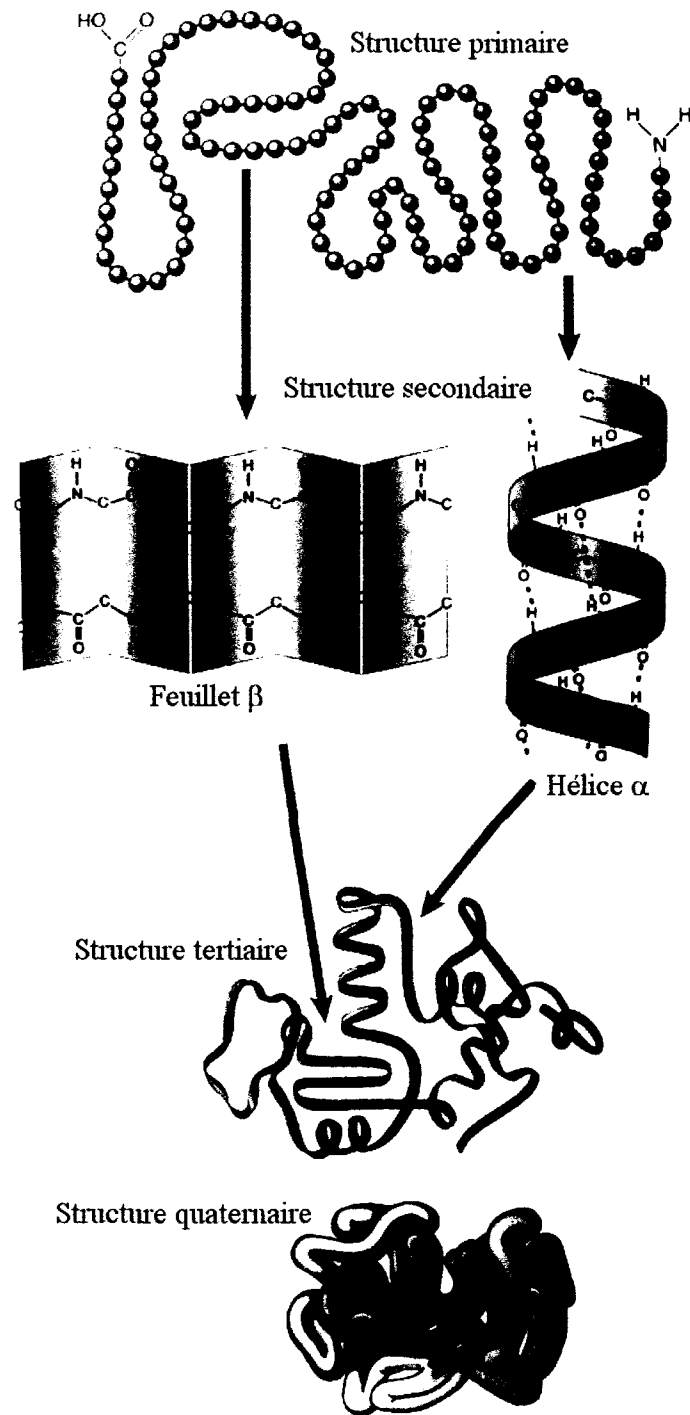
Comme le propose la tâche du terme d'origine, les chaperonnes moléculaires (le terme « chaperonne » sera utilisé dans ce document pour désigner les chaperonnes moléculaires afin d'alléger le texte) guident les protéines dans leur maturation jusqu'à l'obtention de la conformation tridimensionnelle adéquate.

### **1.1.1 La structure tridimensionnelle des protéines**

Pour qu'une protéine soit fonctionnelle, les atomes qui la composent doivent se positionner de façon très précise dans l'espace. Une petite variation peut entraîner l'inactivation de la protéine et même, si elle est généralisée ou que la protéine est essentielle, la mort cellulaire.

La description de la structure protéique est décomposée en quatre éléments distincts mais fortement coopératifs, les structures primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire (figure 1.1). L'agencement des éléments de la structure primaire (les acides aminés) forme la structure secondaire, de la même façon que les éléments de celle-ci façonnent l'apparence de la structure tertiaire.

Une grande variété de forces est impliquée pour assurer la cohésion ou la répulsion des atomes de la protéine (9). Les forces électrostatiques à l'œuvre compren-



**Figure 1.1: Organisation structurale des protéines.** On appelle structure primaire l'alignement des acides aminés formant la séquence alors que la structure secondaire décrit l'arrangement en hélice ou en feuillets de la séquence. La structure tertiaire résume l'agencement tridimensionnel des structures secondaires et la structure quaternaire survient lorsqu'il y a formation d'oligomères.



nent les forces entre charges, qui se forment lorsque un acide aminé est ionisé sous l'effet du pH, les forces dipolaires, dont le plus fréquent mais non le moindre est sans doute celui du lien peptidique et les interactions de Van der Waals (de dispersion), qui décrivent le comportement associatif des atomes sur des distances moyennes et de répulsion sur de courtes distances. Les forces de dispersion regroupent aussi les phénomènes d'inégalité de charge autour d'un groupe d'atome et de dipôles induits. Dans cette optique, ces forces décrivent aussi le partage d'hydrogène entre deux atomes électronégatifs qu'est le pont hydrogène (10).

L'ensemble de ces forces oblige la protéine à positionner ses atomes en structures organisées généralement en feuillets ou en hélices pour satisfaire aux exigences électrostatiques et aux limitations d'angles et de distance entre les atomes. C'est essentiellement ces structures secondaires et leur arrangement (structure tertiaire) qui seront affectées lors de dénaturation protéique. Comme on sait que la séquence en acides aminés d'une protéine détermine à la fois la structure finale et le processus de repliement de cette protéine (11), il est à prévoir que des séquences plus ou moins spécifiques du polypeptide seront impliquées dans sa reconnaissance par la chaperonne.

On imagine facilement que si certaines régions sont exposées automatiquement au cytosol dans le cas des polypeptides en élongation, les protéines matures ne dévoileront ces régions qu'à l'état dénaturé. La dénaturation résulte d'une modification de la cohésion des atomes par une variation de l'intensité des forces qui la maintiennent. Un changement de pH crée un changement de charge sur quelques acides aminés, une différence de force ionique influence les dipôles et charges induites et une hausse de température modifie les propriétés physiques de la protéine (12). C'est de cette façon que s'exposent des segments d'acides aminés souvent hydrophobes et normalement enfouis au cœur de la protéine. Cette réaction n'est pas toujours réversible spontanément, même en revenant aux conditions initiales très lentement.

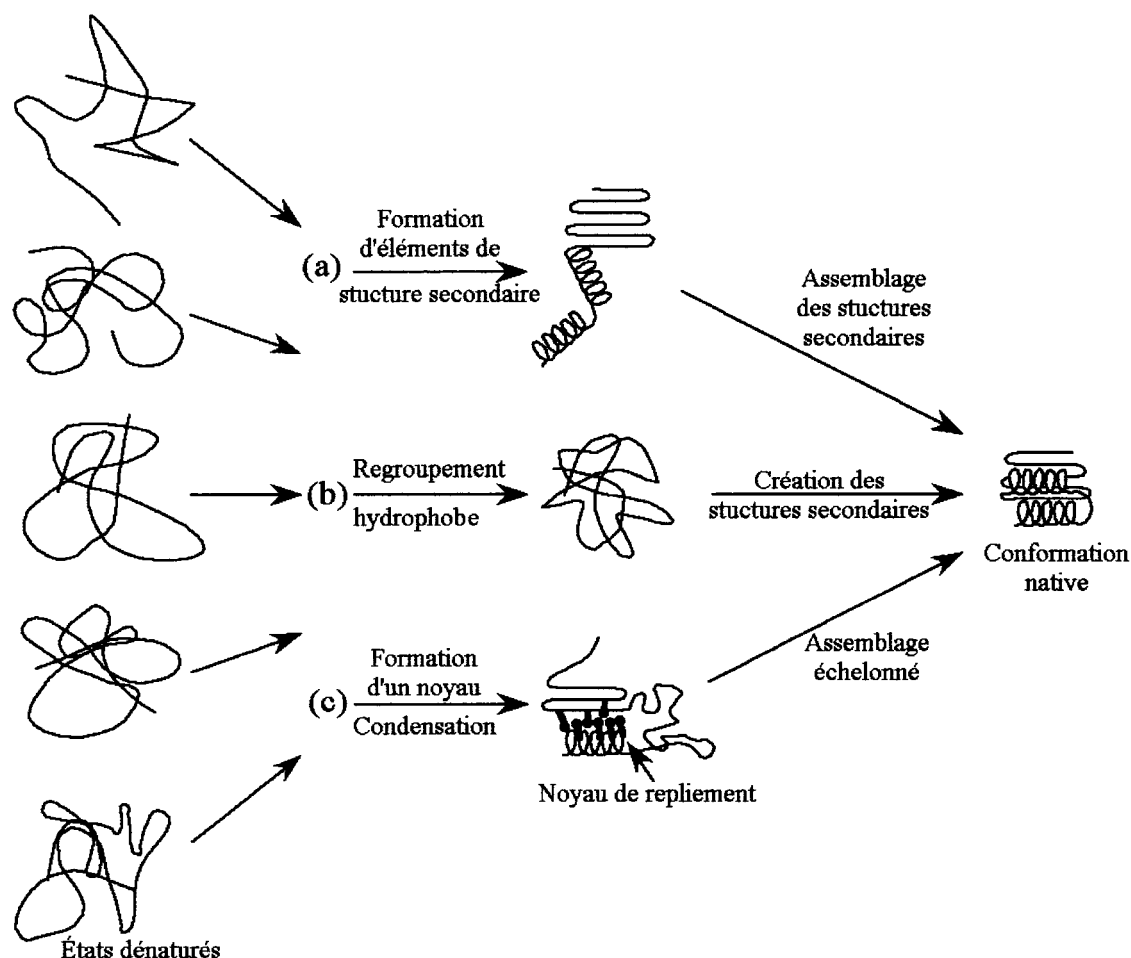
### 1.1.2 Repliement protéique spontané et assisté

La solubilité et les charges des acides aminés, dépendantes de l'environnement, gèrent l'affinité qu'ils ont les uns pour les autres. Ainsi, il est possible que le retrait progressif d'agents dénaturants ait pour conséquence un retour à l'état natif de la protéine. Le processus peut prendre différentes voies pour se réaliser (figure 1.2). Les méthodes employées par les protéines pour se replier diffèrent d'une protéine à l'autre et dépendent des conditions cellulaires.

Que les structures secondaires se forment en premier ou qu'elles soient construites postérieurement à la formation d'un noyau tridimensionnel de regroupement, il n'existe qu'un seul état final, dit état natif, qui permet à la protéine d'être fonctionnelle. Lorsque les voies présentées à la figure 1.2 ne peuvent être utilisées parce qu'elles conduiraient à des structures erronées, un repliement assisté de chaperonnes prend le relais. De la même façon que ce ne sont pas toutes les protéines qui nécessitent l'action des chaperonnes, les protéines qui en font usage n'utilisent pas toutes les mêmes. Un grand nombre de protéines chaperonnes cohabitent dans la cellule, et elles sont complémentaires par leur action.

### 1.1.3 Les différentes familles de chaperonnes

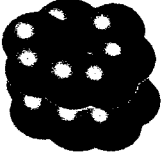




Le groupe des chaperonnes moléculaires s'agrandit régulièrement par la découverte de nouveaux membres dont la fonction de chaperonne est révélée. En effet, en plus de la découverte de nouvelles protéines à fonction de chaperonne, plusieurs protéines dont la fonction est connue depuis longtemps montrent également une activité de chaperonne. Très fortement conservées dans l'évolution et présentes autant dans les archéobactéries et les procaryotes que dans les cellules des eucaryotes, plus de 20 familles différentes de chaperonnes ont été découvertes. Aussi, des chaperonnes spécifiques à certains types de tissus ou d'organelles ont été observées (13). La majorité des chaperonnes sont des protéines de choc thermique (Hsp, pour *heat shock protein*) ; leur action est normalement stimulée par la hausse de température. On ne présentera dans ce document que les familles de chaperonnes qui interagissent d'une façon ou



**Figure 1.2 : Processus de repliement spontané des protéines.** Les stratégies de repliement protéique, à partir d'un état dénaturé, incluent (a) la formation des éléments de structure secondaire suivie de leur assemblage, (b) un enfouissement regroupant les acides aminés hydrophobes, les éléments de structure secondaire se formant par la suite et (c) la formation initiale d'un foyer de repliement de quelques acides aminés entraîne le reste de la structure séquentiellement.

d'une autre avec Hsp70, qui est le sujet de l'étude. Ces familles de chaperonnes sont présentées au tableau 1.1, avec leurs co-chaperonnes et un résumé de leurs fonctions (14). Hendrick et Hartl décrivent les chaperonnes du tableau 1.1 comme « un groupe très varié de protéines qui ont la capacité de lier et stabiliser des conformations instables de d'autres polypeptides, et qui, par des cycles répétés de liaison et de libération du substrat protéique, facilitent le repliement ou l'assemblage requis » (15). Implicitement, cette définition informe qu'à la différence de certaines protéines qui catalysent le

Tableau 1.1: Résumé des principales chaperonnes et de leur fonction

Familie de chaperonne	Procaryotes			Eucaryotes		
	Nom	Fonction(s)	Cofacteur(s)	Nom	Fonction(s)	Cofacteur(s)
 <b>Hsp60</b> Chaperonines	GroEL	Repliement protéique dépendant de l'ATP, Interagit avec 15-30% des protéines	GroES	TRiC/CC T	Comme GroEL, Interagit avec l'actine et la tubuline	Hsp10
 <b>Hsp70</b>	DnaK, Hsc62-66	Prévient l'agrégation, régule la réponse au choc thermique (GrpE)	DnaJ, GrpE	Ssa-4, Ssb1-2, Hsc73, Hsp72	Comme DnaK, Impliquée dans le transport cellulaire	Ydj1, Hsp40, Mge1
 <b>Hsp90</b>	HtpG	Régule l'assemblage des facteurs de transcription	–	Hsp82	Régule l'assemblage des récepteurs stéroïdiens et des facteurs de transcription	–
 <b>Hsp100</b>	ClpA-X, ClpB	Dissolution d'oligomères et d'agrégats protéiques	ClpP, DnaK	Hsp104	Comme ClpA, B	Hsp70, Hsp40
 <b>sHsp</b>	IbpA-B, Hsp16,5	Forment un 24-mère qui lie les polypeptides dépliés	–	Hsp12-42	Lient et stabilisent les protéines dépliées	–

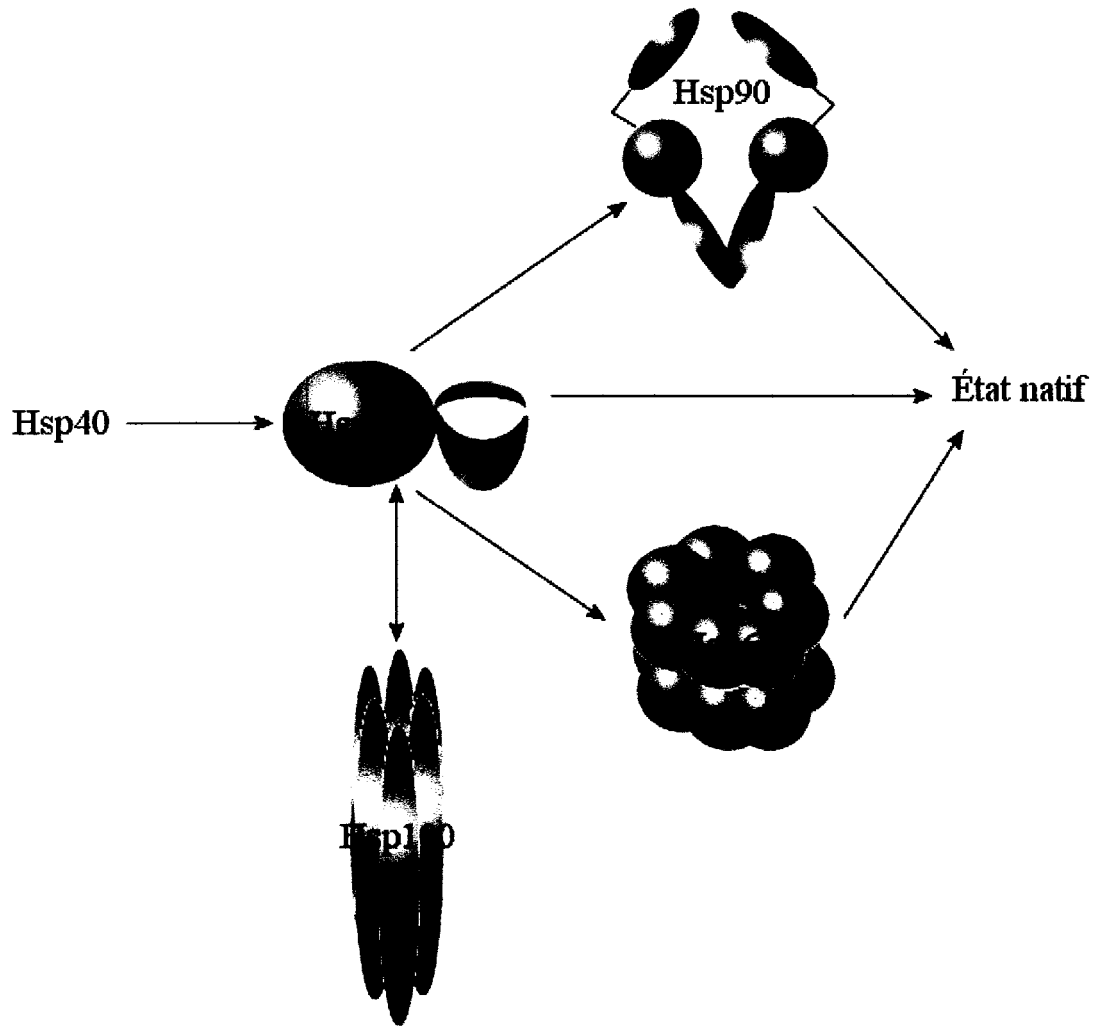
repliement par une transformation chimique du polypeptide comme le fait la PDI (protein disulfide isomérase), qui aide à former les ponts disulfure adéquats, les chaperonnes n'apportent pas d'information stérique au processus de repliement.

Lorsqu'on fait référence aux chaperonines, il s'agit de la famille de Hsp60, un groupe de chaperonnes particulier dont les monomères sont d'environ 60kDa, qui s'organise en double heptamère (16) et qui accueille le polypeptide instable en son sein (17). Contrairement aux autres chaperonnes, les chaperonines interagissent avec la totalité de la séquence protéique puisque l'intégralité du substrat est à l'écart du solvant, à l'intérieur du cylindre que forment les monomères de Hsp60 (18). De séquence très conservée, les chaperonines sont présentes dans les mitochondries, les chloroplastes, les eubactéries, les archéobactéries et dans le cytosol des eucaryotes.

Récemment, la toile d'araignée que forme le réseau d'interactions entre les différentes chaperonnes a commencé à être dévoilée (19,20). Ainsi, il a été mis en évidence que plusieurs substrats s'insèrent au cœur des chaperonines par l'entremise des Hsp70s (21). De nombreuses associations entre les chaperonnes sont à l'œuvre à l'intérieur d'une cellule et de nombreux substrats polypeptidiques sont transférés d'une protéine à l'autre (figure 1.3).

#### **1.1.4 Interactions entre familles de chaperonnes**

L'examen attentif du tableau 1.1 montre que Hsp70 est à la fois une chaperonne et un cofacteur d'une autre chaperonne, Hsp100. En effet, pour accomplir sa fonction, Hsp100 doit former un complexe avec Hsp70 (22,23), qui l'aidera à dissoudre les agrégats protéiques et s'occupera ensuite du substrat polypeptidique pour la suite du processus de renaturation (23). De la même façon, la co-chaperonne Hsp40 de Hsp70, dont l'une des tâches est de repérer le polypeptide déplié pour l'apporter à Hsp70, a aussi une activité de chaperonne intrinsèque (24).



**Figure 1.3 : Transfert de substrat entre les familles de chaperonnes.** Le repliement protéique est le résultat d'un travail d'équipe entre les différentes familles de chaperonnes. Les flèches indiquent que le substrat est transféré. Notez que le transfert vers un état final natif passe indispensablement par la chaperonne Hsp70.

D'abord reconnue pour sa fonction dans le cycle d'hydrolyse de l'ATP de Hsp70, le rôle cellulaire de Hsp40 ne cesse d'être majoré par les récentes découvertes. Les Hsp40s, moins efficaces que les Hsp70s mais liant plusieurs substrats communs, sont des inhibiteurs compétitifs des Hsp70s (25). Il a même été proposé que les Hsp40s seraient responsables du transfert de substrat entre certaines familles de chaperonnes comme le signal rétrograde du substrat de Hsp90 à Hsp70 (26).

Comme le souligne la figure 1.3, les polypeptides dépliés seront fréquemment liés à Hsp70 en état intermédiaire. Hsp70 se chargera ensuite de replier différents polypeptides à l'aide de ses co-facteurs ou encore de transférer les substrats à Hsp60 (19) ou à Hsp90 (27). Il reste encore beaucoup de travail à faire dans le domaine des mécanismes de coordination des fonctions des familles de chaperonnes dans la cellule, et il est probable que d'autres liens seront mis en évidence prochainement. Le fonctionnement des chaperonnes dans la cellule résulte d'une action concertée entre les familles pour la synthèse des protéines et la protection, l'assemblage et la dégradation des structures protéiques existantes.

#### **1.1.5 Aspects cellulaires des chaperonnes**

La majorité des chaperonnes sont particulièrement bien conservées entre les différents organismes (60% d'identité entre Hsp70 de *E. coli* et Hsp70 humaine) (28). Dans l'évolution des espèces, les chaperonnes seraient donc apparues très tôt et leur rôle se serait précisé au cours des années. Comme la fonction d'une protéine est conditionnée par sa structure tertiaire et que les structures tridimensionnelles que forment les protéines sont formées de chaînes polypeptidiques très longues, la nécessité des chaperonnes pourrait avoir une origine très lointaine.

D'ailleurs, plusieurs de ces chaperonnes sont essentielles à la survie de la cellule ou encore leur absence cause des maladies. Par exemple, un mauvais fonctionnement des chaperonnes est observé dans les cellules des gens atteints d'Alzheimer (29) et les Hsp70s ne sont pas pleinement fonctionnelles chez les patients ayant la fibrose kystique (30).

En plus de leur fonction d'accompagnateur de protéines dénaturées, plusieurs chaperonnes ont aussi une fonction secondaire. Cette propriété des protéines de choc thermique permet à la cellule de réagir intégralement à un stress par une réponse unifiée de la cellule. Souvent, il s'agit d'un comportement de protéase, ce qui a l'avantage de fournir une porte de sortie à la cellule : lorsque les conditions cellulaires deviennent extrêmes, plusieurs chaperonnes seront appelées à dégrader les protéines mal formées

(31,32). D'autres, comme Hsp70, sont impliquées dans les chaînes métaboliques de signalisation cellulaire ou encore dans la transcription de l'ADN et la division cellulaire (5).

## **1.2 Protéines Hsp70**

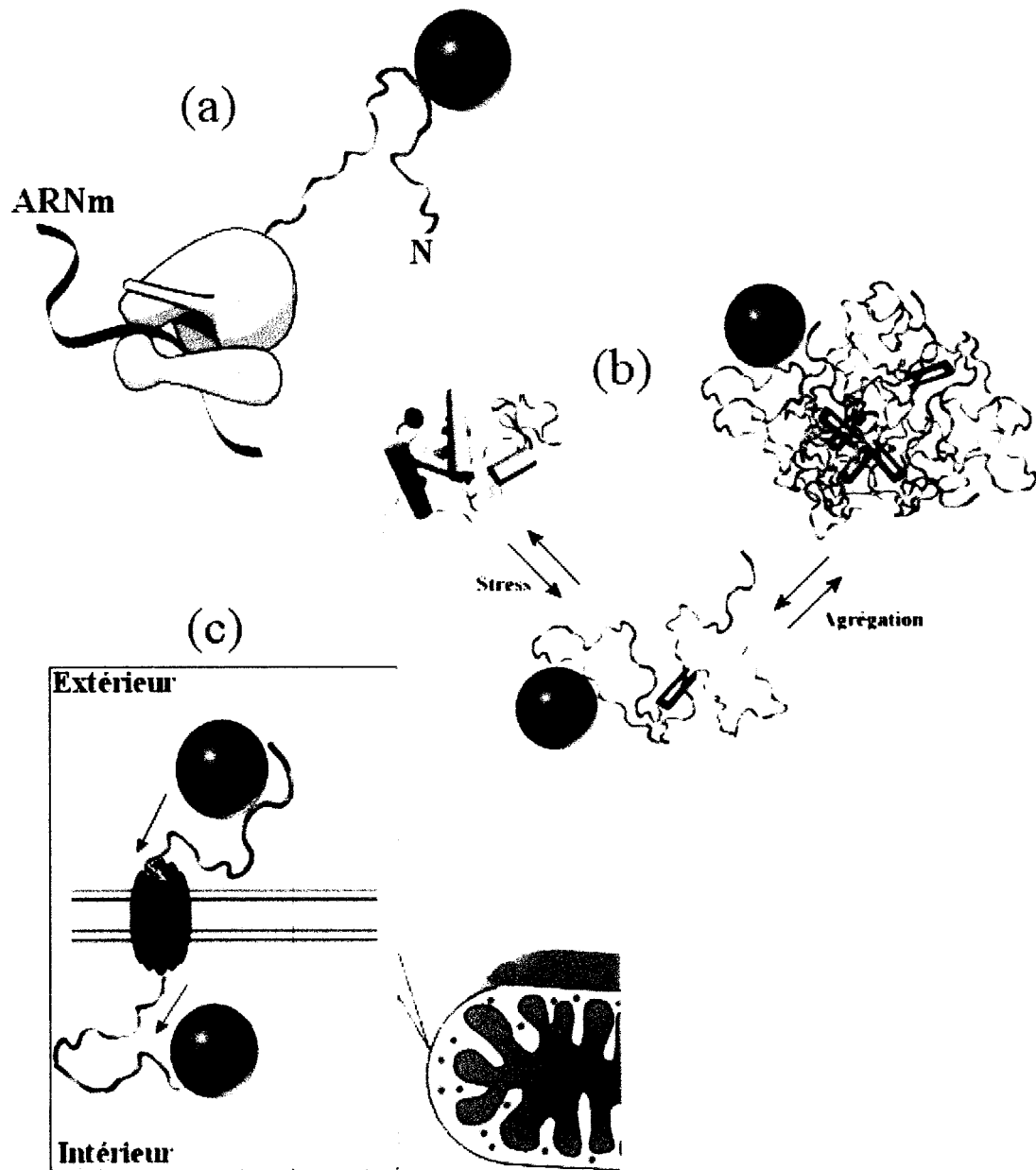
Les protéines de choc thermique de 70kDa (les Hsp70s) sont une classe de protéines dont les membres sont distribués dans les organelles des eucaryotes, dans le cytosol et dans les bactéries. Même si elles sont très semblables, il existe presque autant de Hsp70s différentes que d'endroits où on peut les rencontrer. Ces protéines, malgré leur nom, ne sont pas exprimées seulement dans les cas de choc thermique mais aussi de façon constitutive. Les nombreuses fonctions des Hsp70s impliquent que ces protéines doivent être présentes quelles que soient les conditions cellulaires.

### **1.2.1 Fonctions des Hsp70s**

Les Hsp70s agissent sur les protéines instables dans diverses situations (figure 1.4). D'abord, elles agissent sur les polypeptides nouvellement synthétisés, et ce dès qu'une partie du polypeptide est sortie du ribosome (33). Son action se concentre alors sur la protection du polypeptide et de ses parties hydrophobes contre les protéases et contre l'agrégation susceptible de se produire à cet instant. La liaison de la chaperonne prévient également la génération de structures non-natives créées spontanément en s'attachant temporairement aux régions hydrophobes (34). D'une manière similaire, les Hsp70s lient les sections susceptibles de former un noyau des protéines dénaturées par un stress cellulaire comme une hausse de la température, du pH, la présence d'oxydants ou une variation de force ionique.

En plus d'un rôle de protection, les Hsp70s replient certains substrats pour leur rendre leur conformation native. Elles agissent alors à l'aide de Hsp40 et parfois d'une autre co-chaperonne pour le repliement. Lorsque les Hsp70s forment un complexe avec Hsp100, elles accomplissent alors le rôle de cofacteur en dissolvant les agrégats





**Figure 1.4 : Les rôles cellulaires des Hsp70s sont diversifiés.** Représentées ici par une bille bleue, elles agissent (a) au niveau de la traduction, sur le polypeptide en élongation ou le polypeptide nouvellement formé, (b) lors de stress cellulaire, lorsque les protéines matures ont tendance à se dénaturer et à s'agréger, et (c), pour assister le passage de protéines au travers de pores membranaires d'organelles.

protéiques et les oligomères (35). Les protéines de choc thermique de 70kDa sont appelées ainsi pour cette hausse d'activité enzymatique observée lors de stress cellulaire

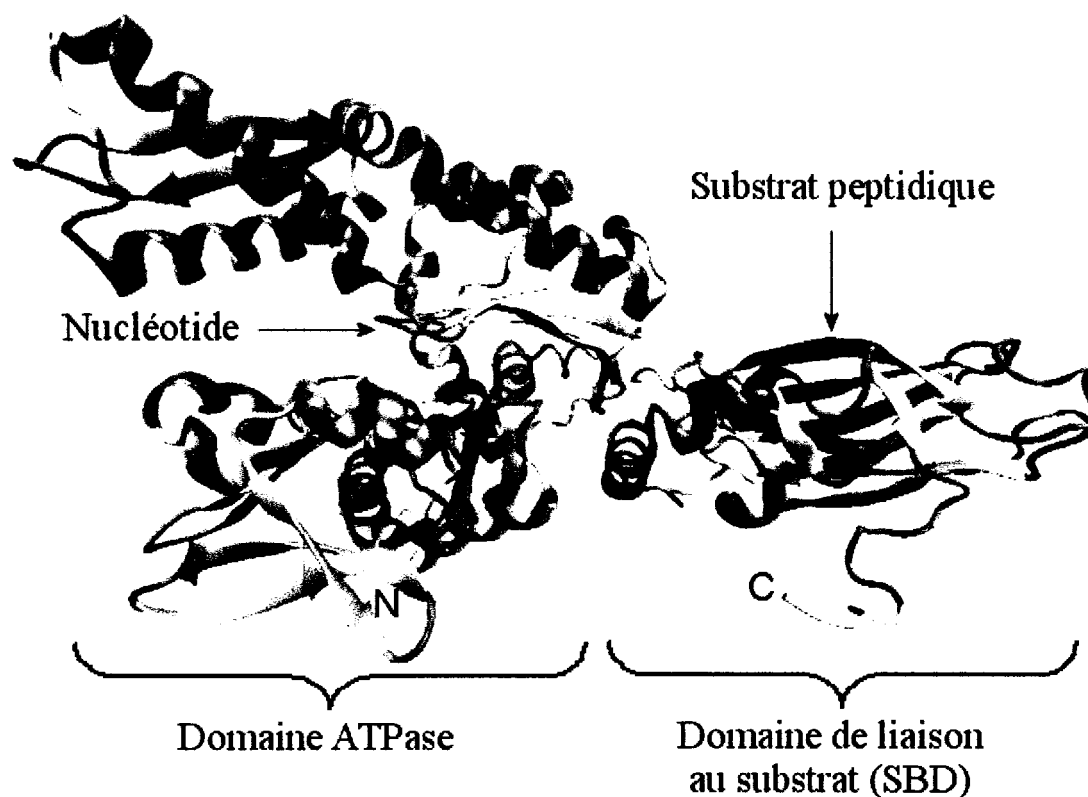
(36), souvent dû à une hausse de température. Par contre, plusieurs activités de ces protéines comme celles de protection et de passage au travers des membranes sont nécessaires même lorsque la cellule ne subit aucun stress.

Il existe de nombreuses façons pour une protéine de pénétrer à l'intérieur d'organelles. La mitochondrie fabrique plusieurs des protéines qui la forment, le réticulum endoplasmique lie les ribosomes qui insèrent les polypeptides directement à l'intérieur. Les vésicules sont aussi un moyen de transport très utilisé. Il existe tout de même de nombreux cas où l'insertion dans une organelle d'une protéine cytosolique doit s'effectuer par les pores de la membrane. Il a été suggéré que la Hsp70 cytosolique ait le rôle de reconnaître, protéger et diriger le polypeptide contenant la séquence-signal vers sa destination (37,38). Pour y pénétrer, les protéines doivent être dépliées mais il est impératif de leur rendre leur conformation native à l'intérieur. Une autre Hsp70 spécifique à l'organelle aurait alors la tâche de rendre sa forme tridimensionnelle à la protéine. Sans doute en partie pour ses nombreux constituants situés dans des endroits tout aussi nombreux, les Hsp70s sont les chaperonnes dont la tâche est la plus variée et elles sont aussi les plus abondantes.

### **1.2.2 Structure des Hsp70s**

Toutes les Hsp70s sont des protéines monomériques composées de deux domaines distincts (figure 1.5). Le domaine ATPase, de 45kDa et dont la fonction est de lier l'ADP et l'ATP est le mieux conservé des deux. Il est relié de façon allostérique au domaine de liaison au substrat (SBD pour substrate binding domain), de 25kDa, qui lie le polypeptide déplié. La base structurale de l'allostérie demeure à ce jour inconnue, mais le récent dévoilement de la structure conjointe des domaines (39,40) favorisera vraisemblablement une meilleure compréhension des liens qui unissent les deux domaines.

Le domaine carboxy-terminal peut à son tour être décrit en deux parties : la part formant un sandwich de feuillets  $\beta$ , de 15kDa, et celle en hélice  $\alpha$  (manquante sur la



**Figure 1.5 : Représentation en rubans de Hsc70 bovine (PDB : 1YUW).** La coloration des rubans indique les structures secondaires de cette structure tronquée de 94 acides aminés à l'extrémité C-terminale. Structure présentant les mutations E213A et D214A, elle est l'unique représentation de la famille des Hsp70s qui inclut les deux domaines (39). Au domaine ATPase se lie le nucléotide (ADP ou ATP) tandis que le domaine SBD lie le polypeptide dénaturé.

figure 1.5) communément appelé « lid », forment une pince qui s'ouvre ou se ferme sous l'action des nucléotides (41).

### 1.2.3 Cycle fonctionnel de Hsp70

L'activité des Hsp70s est contrôlée par la présence d'un nucléotide lié au domaine N-terminal (42). L'équilibre entre les formes enzymatiques montre une forte tendance vers les comportements suivants face aux nucléotides : lorsque l'ATP est présent, l'enzyme est en forme à basse affinité pour le polypeptide-substrat et la pince du SBD est alors en conformation ouverte (figure 1.6) ; au contraire, la liaison de l'ADP montre l'enzyme

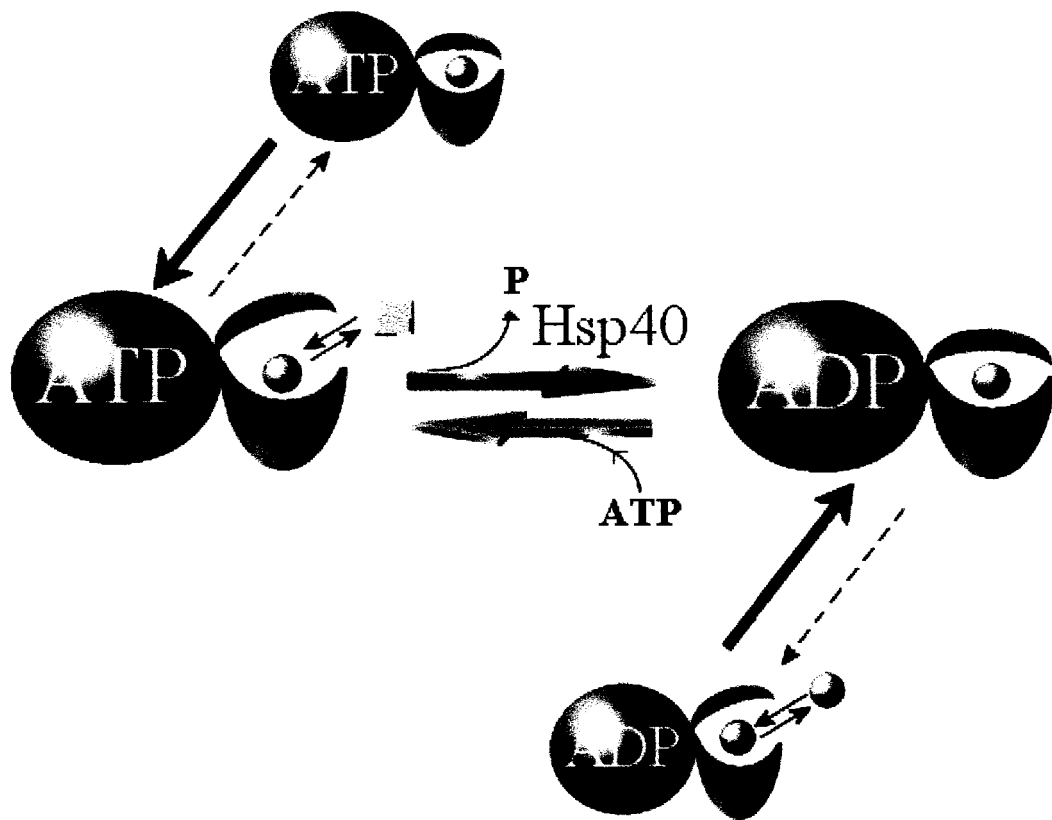
sous une forme à haute affinité pour le substrat, et sa pince du domaine C-terminal est alors fermée (43). La co-chaperonne Hsp40 accélère l'hydrolyse de l'ATP et le changement structural, elle existe dans tous les compartiments qui contiennent des protéines Hsp70s. Parfois, un autre cofacteur jouant le rôle d'échangeur de nucléotides vient catalyser la réaction inverse.

Comme les nucléotides modulent l'affinité du SBD pour le substrat, la liaison du polypeptide stimule l'hydrolyse du nucléotide (44,45). Le cycle de liaison et de relâchement du substrat se répèterait ainsi plusieurs fois jusqu'à ce que le polypeptide retrouve sa conformation native. L'énergie de l'ATP serait vraisemblablement utilisée pour diriger le cycle des nucléotides dans la bonne direction ou encore pour catalyser les changements structuraux du substrat.

Pour décrire le comportement des Hsp70s, deux modèles d'action principaux ont été proposés et retenus. Dans le premier, les chaperonnes ont un rôle passif : les cycles de liaison/retrait du substrat n'ont comme objectif que d'empêcher les polypeptides de se replier incorrectement ou de s'agréger (46). Le deuxième modèle propose que les cycles induisent le dépliement local de la structure, permettant ainsi de surmonter les barrières cinétiques, ce qui serait nécessaire au repliement natif du polypeptide (47). Les deux voies de repliement seront discutées plus en détail pour le cas particulier des Hsp70s bactériens à la dernière section de ce chapitre.

### **1.3 DnaK de *E. coli*, Hsp70 bactérien**

Le membre le plus connu de la famille des Hsp70s, pour tous les organismes confondus, est sans doute DnaK d'origine bactérienne. La bactérie *E. coli* produit trois représentants de la famille des Hsp70s, tous présents de façon constitutive : Hsc66, Hsc62 (aussi appelés HscA et HscC, respectivement) et DnaK. Constituant 1% de la quantité totale de protéines de la bactérie dans des conditions normales, DnaK voit sa proportion augmenter à 3% dans des conditions de choc thermique ( $\geq 42^{\circ}\text{C}$ ) (48).



**Figure 1.6 : Modulation de la conformation des Hsp70s par les nucléotides.** Quand l'ATP est lié au domaine N-terminal, l'équilibre tend vers des protéines avec un domaine de liaison au substrat en conformation ouverte. La conformation privilégiée du SBD est la forme fermée lorsque l'ADP est lié à l'enzyme.

### 1.3.1 Structure de DnaK

DnaK est une protéine monomérique de 69kDa et de 638 acides aminés. L'assemblage tridimensionnel de DnaK s'apparente fortement à celle de Hsc70 bovine présentée à la figure 1.5. Comme les autres de sa famille, elle est composée d'un domaine N-terminal de 45kDa liant les nucléotides et d'un domaine de liaison au substrat de 25kDa. Contrairement à la Hsc70 de la figure 1.5, les domaines n'ont pas pu être cristallisés ensemble mais le sont séparément. La variation de la séquence entre les espèces est concentrée principalement sur le SBD, ce qui a comme conséquence une affinité différente pour les substrats polypeptidiques entre les membres de la famille des Hsp70s.

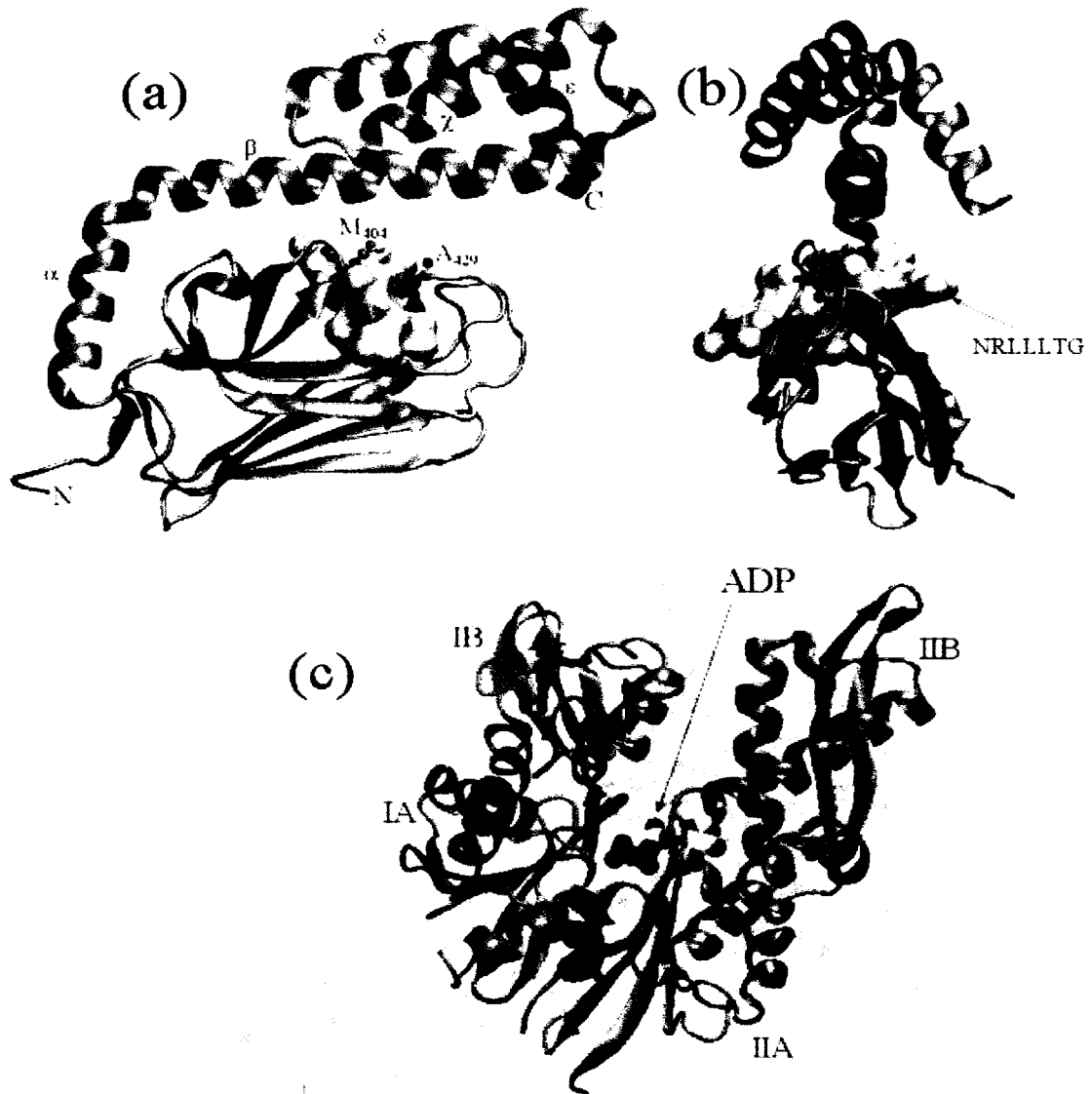
Le domaine SBD de DnaK est formé d'un sandwich de feuillets  $\beta$  au-dessus duquel se glisse le substrat, sous l'arche hydrophobe que forme la jonction des acides aminés M404 et A429 (figure 1.7) et d'un « lid » de 5 hélices ( $\alpha$ - $\epsilon$ ) dont la position relative à l'autre partie est flexible. Le domaine constitué des résidus 389 à 607 est cristallisé à une résolution de 2 Å avec un court peptide de 7 acides aminés de séquence NRLLLTG (49).

Cristallisé en complexe avec son échangeur de nucléotides à une résolution de 2,8 Å (50), le domaine ATPase de DnaK lie l'ATP ou l'ADP avec une grande affinité ( $K_d \text{ ATP} \approx 1\text{nM}$  (51),  $K_d \text{ ADP} \approx 25\text{nM}$  (52)). Le nucléotide se lie avec un ion  $\text{Mg}^{2+}$  et deux ions  $\text{K}^+$  qui stabilisent le ligand. Une étude assez récente par résonance magnétique nucléaire (RMN) a révélé une grande flexibilité dans la disposition relative des différents sous-domaines (IA, IIA, IB et IIB) qui pourrait être relative à l'ouverture et la fermeture de la cavité dans laquelle se glisse le nucléotide (53). Ainsi, ce domaine comme le SBD possèderaient un système de régulation de l'entrée des ligands, ce qui pourrait expliquer en partie la possibilité d'un comportement allostérique entre les domaines.

### 1.3.2 Cycle fonctionnel et cofacteurs de DnaK

De la même façon qu'il a été décrit à la section 1.2.3 pour toutes les Hsp70s (figure 1.6), le cycle fonctionnel de DnaK comprend un état à haute affinité (avec ADP) et un état à basse affinité (avec ATP) pour le substrat polypeptidique. Bien que le cycle soit fonctionnel en absence de cofacteurs, la vitesse de réaction est très fortement augmentée par leur présence.

Pour accélérer l'hydrolyse de l'ATP, le cofacteur DnaJ (une co-chaperonne) de la famille des Hsp40s est utilisé par la bactérie. DnaJ est une protéine monomérique de 41kDa qui est apte à lier des polypeptides dépliés, et on lui attribue par ce fait même une



**Figure 1.7 : Structure des domaines de liaison au substrat et ATPase de DnaK.** En (a) et en (b) est représenté le domaine de liaison au substrat (PDB : 1DKX) avec une rotation de 90° l'une par rapport à l'autre. En jaune, un peptide de 7 acides aminés cristallisé avec la protéine signale l'endroit où se lie le substrat. Les acides aminés M404 et A429 qui forment une arche hydrophobe autour du polypeptide sont mis en évidence ainsi que l'appellation des hélices formant le « lid », en violet. En (c), co-cristallisé avec GrpE, le cofacteur échangeur de nucléotides de DnaK, est représenté le domaine de liaison aux nucléotides (PDB : 1DKG). L'ADP est ajouté à son site de liaison, entre les sous-domaines IA-IB et IIA-IIB.

fonction de chaperonne propre (15, 54, 55). En plus d'accélérer de façon notable l'hydrolyse de l'ATP ( $K_{cat} = 5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  pour DnaK seule et  $K_{cat} = 0,5 \text{ s}^{-1}$  dans des conditions optimales avec DnaJ (42)), DnaJ procède à la reconnaissance du substrat par son domaine riche en cystéines (56).

L'autre cofacteur, GrpE, agit en qualité d'échangeur de nucléotides en facilitant le retrait de l'ADP pour lui substituer une molécule d'ATP. GrpE forme un dimère d'une masse totale de 44kDa (figure 1.7 (c)) dont la partie en feuillet  $\beta$  est rattachée au domaine ATPase (50, 57). La co-chaperonne montre la particularité structurale de deux longues hélices  $\alpha$  de 100 Å (une par monomère), liées l'une à l'autre à 30°C et qui se séparent sous l'effet d'une hausse de température (58, 59). On pense que ce changement structural de GrpE serait à l'origine de la reconnaissance et de la signalisation à DnaK du choc thermique (60-62).

#### 1.4 Substrats protéiques de DnaK

Le comportement des chaperonnes suggère qu'elles doivent se lier aux sections hydrophobes des protéines pour exercer leur action, ce qui est véridique dans l'ensemble. Cependant, la majorité sinon toutes les protéines possèdent au moins une petite section hydrophobe, mais ce ne sont pas toutes les protéines qui sont reconnues et prises en charge par les chaperonnes. La théorie de l'hydrophobicité ne suffit pas non plus à expliquer la spécificité des substrats pour une chaperonne en particulier ni comment certains polypeptides sont reconnus par les chaperonnes mais pas par DnaK, par exemple.

Par ailleurs, il a été démontré que beaucoup de protéines thermosensibles de *E. coli*, ne possédant pas à priori d'autres caractéristiques communes, peuvent former un complexe avec DnaK (22). Par conséquent, il n'existe pas de motif précis et invariable composé de quelques acides aminés reliant tous les substrats entre eux. La solution de l'énigme de l'affinité des chaperonnes se situe entre les deux hypothèses : le motif de reconnaissance n'est pas une séquence précise d'acides aminés mais plutôt une séquence



ayant un profil hydrophobe et parfois une certaine affinité pour des acides aminés chargés.

#### **1.4.1 Caractéristiques physiques du site de liaison du substrat sur DnaK**

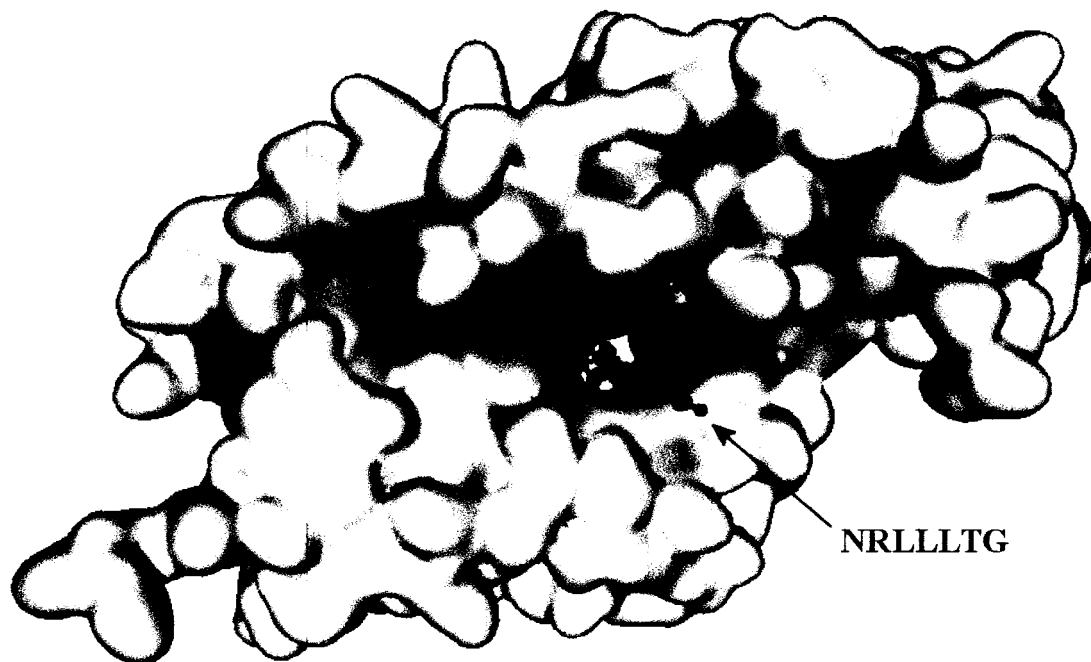
L'examen du site de liaison de la chaperonne DnaK montre un puits particulièrement hydrophobe à l'endroit où se lie le peptide (figure 1.8). Le résidu central du substrat est complètement protégé du solvant par sa position dans une profonde poche hydrophobe qui peut abriter des acides aminés non-polaires, avec une affinité particulière pour les leucines (49). Les 2 résidus adjacents de part et d'autre ne sont que partiellement exposés au solvant.

Le potentiel de surface autour du centre de liaison du peptide est majoritairement négatif, ce qui prédit une certaine préférence pour les acides aminés chargés positivement. Puisque l'introduction de contraintes stériques modifie la vitesse de dissociation du substrat sans affecter pour autant celle de son association (34), on suppose que la région de liaison est particulièrement flexible pour accommoder des polypeptides variés.

#### **1.4.2 L'étude de l'affinité des peptides pour DnaK**

Il existe de nombreuses études portant sur la spécificité de DnaK pour ses substrats. Le principe d'utiliser des combinaisons d'acides aminés rassemblés en de courts peptides est simple et plusieurs méthodes permettent d'évaluer l'affinité pour l'enzyme par la suite.

D'abord, la longueur optimale du peptide a dû être déterminée. Évalué de 7 à 11 acides aminés (63), ce nombre indique la quantité d'acides aminés interagissant avec le site actif de l'enzyme. Puis, on mesure l'affinité de différents assemblages par la formation du complexe visible par HPLC (64), par spectroscopie de masse et, à plus grande échelle, par un système de reconnaissance par anticorps dirigés contre DnaK sur










**Figure 1.8 : Représentation du SBD de DnaK (PDB : 1DKX) montrant l'hydrophobicité des régions.** En gris sont les acides aminés hydrophiles et en bleu les plus hydrophobes. Le domaine de liaison au substrat de DnaK forme une pince dont le centre, où se positionne le polypeptide, est particulièrement susceptible d'être comblé par des acides aminés hydrophobes.

des grilles de cellulose auxquelles sont liés les substrats potentiels (65, 66). À la figure 1.9 (a) sont regroupés quelque uns de ces peptides avec une indication de leur affinité pour DnaK alors que des exemples du motif optimal obtenu par les différentes études et méthodes paraît sur la même figure, en (b).

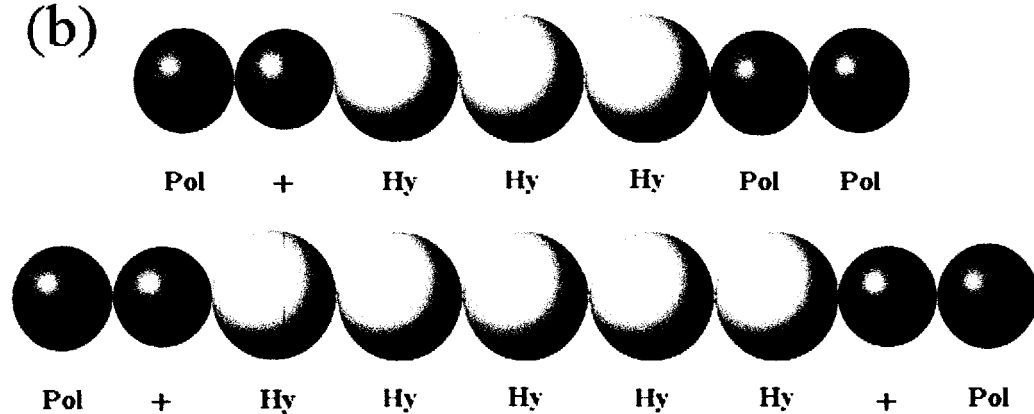
### 1.4.3 Les motifs recherchés par DnaK

Quelle que soit sa longueur, la cible peptidique de DnaK sera composée de résidus hydrophobes au centre, flanqués de part et d'autre d'acides aminés hydrophiles ou chargés positivement. Jusqu'à 5 acides aminés hydrophobes pour 6 hydrophiles peuvent être insérés dans le creux de la pince du SBD. Les résidus hydrophobes les plus recherchés sont la leucine, l'isoleucine, la phénylalanine et la tyrosine tandis que

(a)                      Peptide                      Affinité pour DnaK

	++++
	++++
	+++
	+++
	++
	+
	-

(b)



**Figure 1.9 :** L'analyse de nombreuses séquences peptidiques indique le motif recherché par DnaK. En (a) sont montrés quelques exemples de courts peptides de 7 acides aminés et l'estimation de leur affinité pour DnaK. Les substrats les plus recherchés sont composés de résidus hydrophobes, préférentiellement larges, entourés d'acides aminés chargés positivement ou hydrophiles. En (b), on présente deux motifs de peptides à haute affinité pour DnaK.

l'arginine est légèrement plus populaire que la lysine du côté des résidus chargés positivement.

Statistiquement, le type de motif de la figure 1.9 (b) est plutôt fréquent : l'occurrence de ce motif se retrouve à tous les 36 résidus, sur la base de la moyenne de fréquence d'apparition des acides aminés dans des banques protéiques (66) et de la constante de dissociation déterminée pour chacun des peptides. En revanche, des sites répondant entièrement à la formulation de la séquence idéale sont trouvés à tous les 84 acides aminés. Cette observation pourrait expliquer la sélectivité réduite de DnaK qui se lie à plusieurs chaînes peptidiques dans un état partiellement ou complètement déplié.

En plus d'expliquer que DnaK puisse former un complexe avec une grande variété de polypeptides, ces statistiques conduisent à l'hypothèse de multiples sites de liaison de DnaK sur un seul substrat. Cette théorie et sa justification seront présentées à la section 1.5. Soulignons simplement pour l'instant qu'elle mène naturellement à la question du mode d'action de l'enzyme.

#### **1.4.4 Les substrats naturels de DnaK**

De nombreuses études ont été réalisées avec de courts peptides, mais peu de travaux sont disponibles en rapport à la structure des substrats protéiques naturels de DnaK (67). Lorsqu'on veut observer le comportement de DnaK en contact avec des substrats protéiques réels, on doit généralement recréer une situation de stress cellulaire car les protéines qui interagissent spontanément avec DnaK dans des conditions physiologiques normales sont rares. Si à une température de 30°C environ 5-10% des protéines globulaires de *E. coli* sont prises en charge par DnaK, ce chiffre augmente considérablement lorsque la cellule entre en choc thermique (68).

Une étude sur la bactérie *E. coli* réalisée in vivo sur des bactéries mutantes  $\Delta$ dnaK gardées pour 60 minutes à 42°C (stress thermique) nous apprend que, comparativement à des bactéries de types sauvage soumises aux mêmes conditions,

l'agrégation des protéines augmente pour atteindre 15 à 25% du total de protéines solubles de *E. coli* (22). Dans ce travail, environ ¼ de ces protéines qui requièrent DnaK ont pu être identifiées par spectroscopie de masse. Comme on pouvait s'y attendre, ces substrats sont généralement de grande taille : 42% de celles-ci ont une masse moléculaire inférieure à 60kDa. Les protéines les plus grosses sont supposées plus vulnérables à la dénaturation thermique et à l'agrégation puisqu'elles forment souvent des complexes et sont moins stables thermodynamiquement (5).

Pour leur part, plusieurs polypeptides en élongation et protéines nouvellement synthétisés requièrent l'intervention de DnaK dans des conditions cellulaires normales. Jusqu'à 18% de ces polypeptides, essentiellement ceux d'une taille supérieure à 30kDa, dépendent du système de DnaK pour leur repliement (69).

#### **1.4.5 La lactalbumine est reconnue comme un substrat par DnaK**

Reproduire *in vitro* la situation de prise en charge d'un polypeptide récemment formé par DnaK n'est pas une tâche aisée. On comprend que l'étude de l'action de DnaK en complexe avec des polypeptides nouvellement formés implique que ces derniers soient dans un état déplié. La dénaturation des protéines par des agents dénaturants ou des températures très élevées réussit à mimer cet état, mais il est essentiel de conserver l'absence de structure en conservant ces conditions pour toute la durée de l'expérimentation. Un retour à des conditions cellulaires normales induit généralement l'agrégation ou la formation d'une structure erronée mais cachant les sections hydrophobes. Or, techniquement, la chaperonne est affectée par un environnement dénaturant, on ne peut donc pas l'observer en complexe avec le polypeptide de cette façon.

Pour pallier ces obstacles, une forme de lactalbumine qui conserve une structure dépliée est parfois utilisée (70, 71). D'une masse de 14kDa et composée de 123 acides aminés, la lactalbumine est une protéine peu compacte dans des conditions normales (figure 1.10 (a)). Sa structure en globule fondu est maintenue essentiellement par quatre ponts disulfure (72). La réduction et la carboxyméthylation des groupements thiols des

cystéines (figure 1.10 (b)) élimine les ponts disulfure et la chaîne polypeptidique de la lactalbumine se caractérise alors par une absence de structure, dans des conditions normales et viables pour DnaK (73, 72).

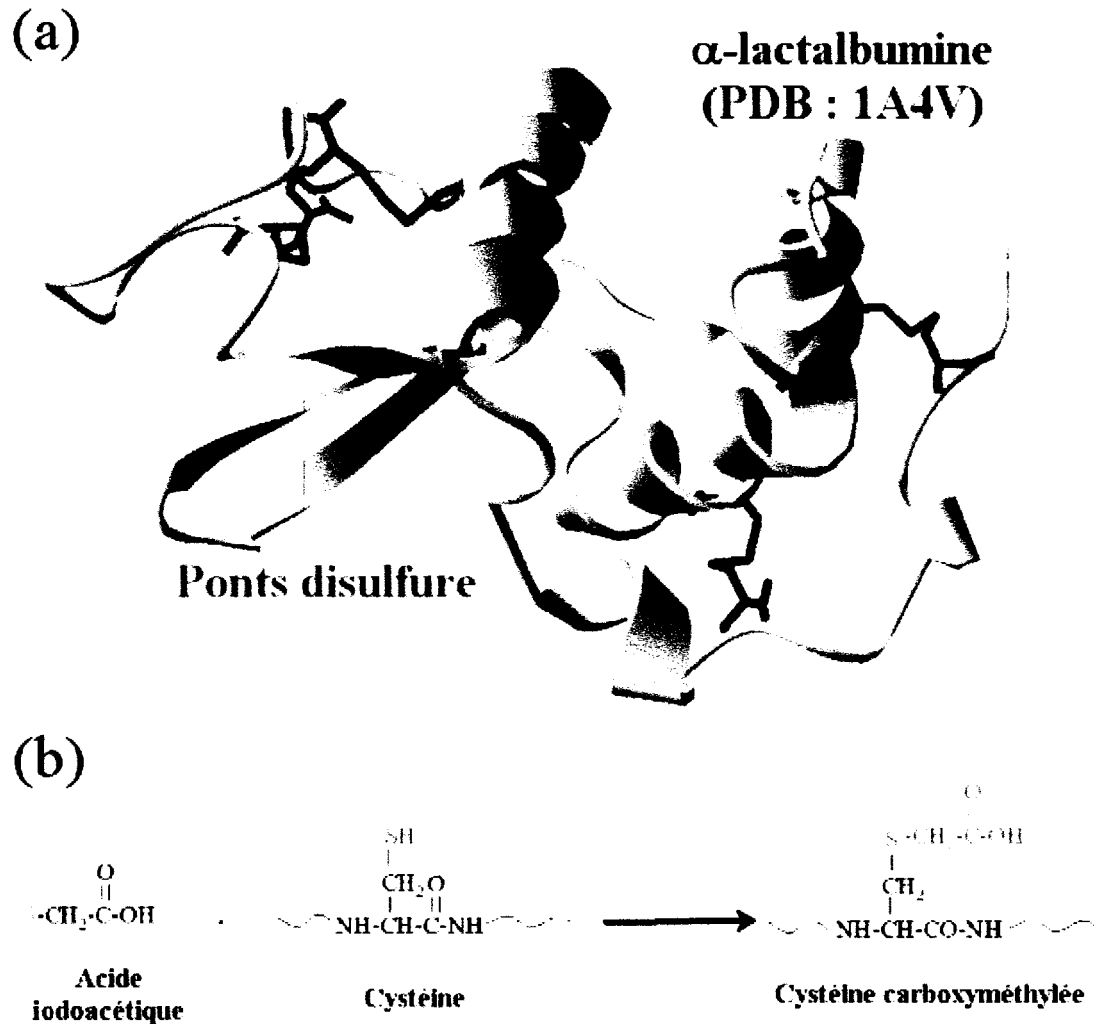
La lactalbumine ainsi transformée, appelée RCMLA (Reduced Carboxy Methylated LactAlbumin), est reconnue par plusieurs familles de chaperonnes. Les chaperonines, Hsp100s et Hsp70s se lient à la RCMLA avec une affinité plus ou moins grande (74-76).

### **1.5 Modèles de mode d'action de DnaK et objectifs du travail**

Un modèle de repliement par DnaK utilisant de l'ATP doit aussi se servir de l'action conjuguée des co-chaperonnes DnaJ et GrpE (77). Bien que certains substrats se replient sous l'action seule de DnaK, ce repliement est fortement ralenti. La diversité des substrats oblige la cellule à utiliser le plein potentiel de ses chaperonnes, et celles-ci doivent agir de façon différente selon la nature du polypeptide et son état au moment de la prise en charge. Repliement, transfert de substrat, désoligomérisation et désassemblage d'agrégats protéiques sont autant de fonctions que de modes d'action possibles pour la protéine DnaK.

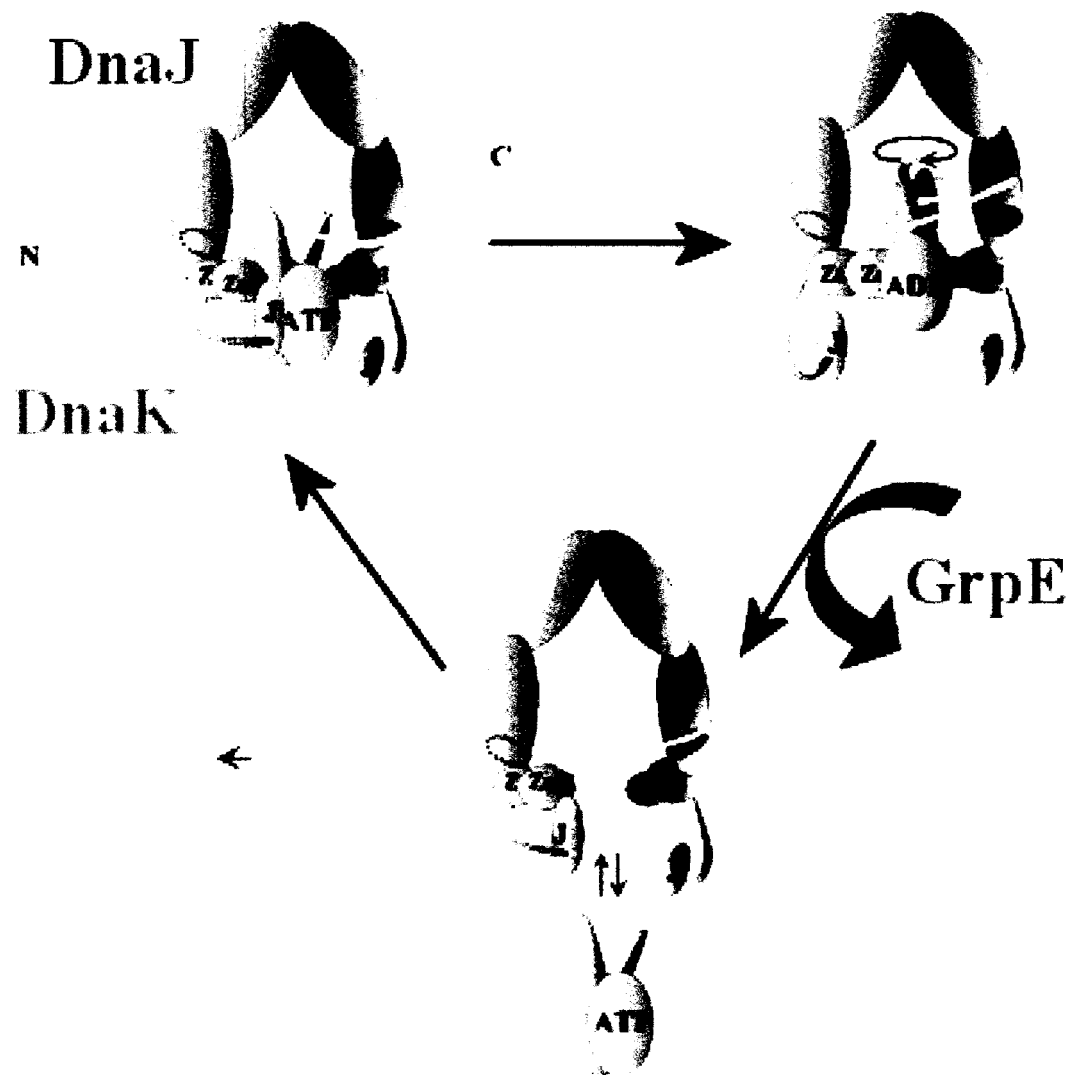
#### **1.5.1 Repliement assisté par DnaK et ses cofacteurs**

Dans le modèle proposé par Landry (47), le repliement catalysé par le système DnaK des polypeptides est cyclique, c'est-à-dire qu'il est répété plusieurs fois sur différents endroits de la séquence (figure 1.11). D'abord, DnaJ trouve le substrat et le conserve par des forces de nature hydrophobe dues aux résidus non-polaires exposés à la surface de son domaine de liaison au substrat en feuillets  $\beta$  (78). Un autre domaine de DnaJ, le J-domain, est le site de liaison de DnaK (79). Sa position place la chaperonne sous forme à basse affinité pour le substrat de façon à ce que la pince du SBD entoure le polypeptide.



**Figure 1.10 : Structure de la  $\alpha$ -lactalbumine bovine (PDB : 1A4V) et carboxyméthylation des cystéines.** La structure de lactalbumine (a) est particulièrement éparse, retenue par les liens disulfure (en rouge). En (b), la méthode utilisée pour rompre les ponts disulfure : les groupements thiols sont réduits puis acétylés par l'acide iodoacétique. De cette façon, on prévient la reformation des liens.

Sous l'action de DnaJ, l'ATP est hydrolysé et le domaine de liaison au substrat de DnaK adopte alors une conformation fermée. DnaK utilise l'énergie de l'hydrolyse pour un mouvement mécanique de nature inconnue, entraînant le polypeptide emprisonné dans sa pince avec elle.



**Figure 1.11: Repliement assisté par DnaK et ses co-chaperonnes (modèle de Landry).** Le polypeptide est reconnu et lié par DnaJ, puis DnaK rejoint le complexe et se positionne de façon à entourer le substrat avec la pince du SBD. L'hydrolyse de l'ATP de DnaK catalysée par DnaJ induit la fermeture de la pince de DnaK et un mouvement aidant au repliement du polypeptide. GrpE intervient alors pour dissocier DnaK du complexe et échanger le nucléotide. La chaîne polypeptidique pourrait alors être déplacée le long de DnaJ et le cycle recommencerait à un autre site sur la chaîne.



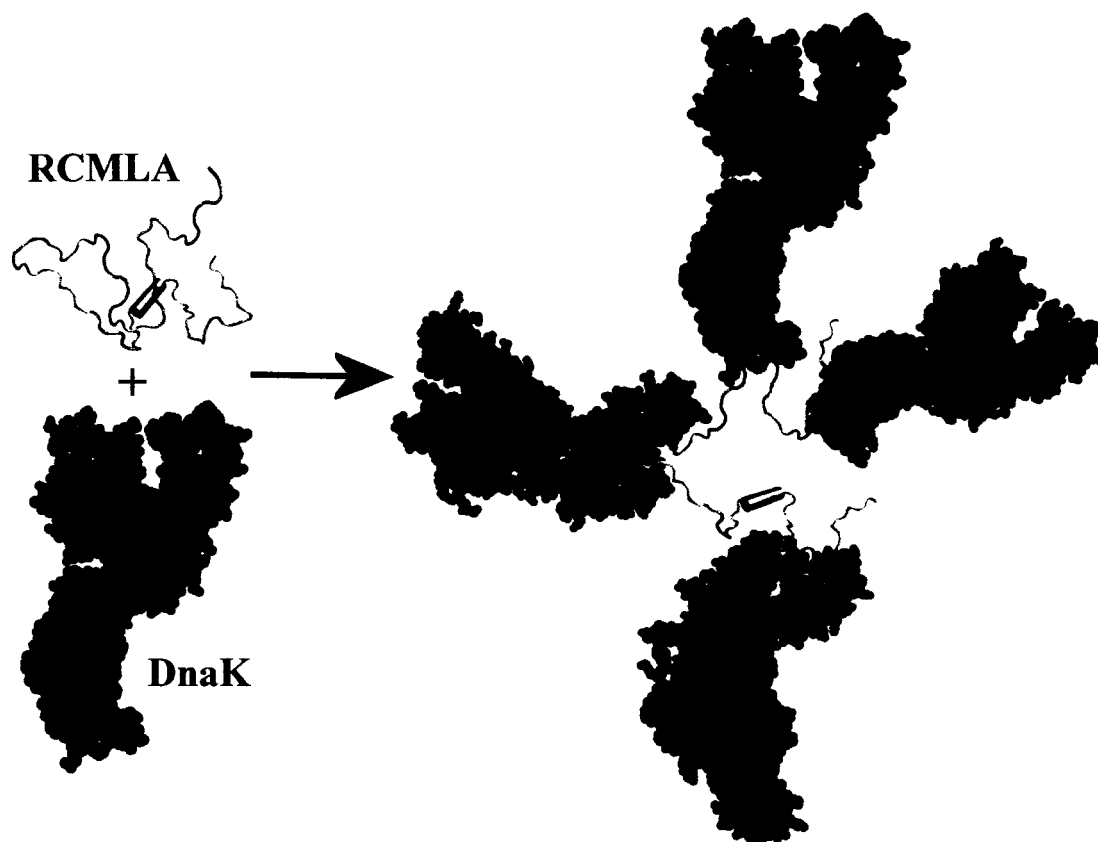
C'est alors que GrpE intervient pour dégager la chaperonne du complexe de DnaJ et de la chaîne peptidique en échangeant le nucléotide lié. Ce retrait de la chaperonne laisse le substrat libre de se déplacer pour exposer un autre site de sa séquence et répéter le cycle à nouveau. Ce modèle hypothétique explique le repliement effectué par le seul système de DnaK mais ne suffit pas à interpréter les autres comportements de DnaK.

### **1.5.2 Modèle d'action de DnaK dit de «holdase»**

Ce modèle, tel que présenté par Slepenkov et Witt (46), ne cherche pas à expliquer comment DnaK replie ses substrats mais plutôt comment elle les empêche de se replier de façon inexacte. Il pourrait également expliquer la capacité de DnaK à empêcher l'agrégation néfaste des protéines et son rôle de protection lors de chocs thermiques. Par ailleurs, ce mode d'action serait utilisé pour réaliser le transfert de substrat d'une famille de chaperonne à l'autre, permettant ainsi le repliement (figure 1.3) et le passage de chaînes polypeptidiques par les pores intramembranaires d'organelles.

Selon cette hypothèse, une seule molécule de substrat est prise en charge par plusieurs unités de DnaK (figure 1.12). En se liant à des endroits distincts de la séquence, la masse imposante de DnaK provoque un encombrement stérique qui prévient la formation de structures tertiaires et même de structures secondaires. Rappelons que, sur une séquence quelconque, le motif de liaison recherché par DnaK se répète statistiquement tous les 36 acides aminés environ (section 1.4.3). Par conséquent, il est probable que plusieurs sites de liaison soient disponibles à la fois, permettant à plusieurs molécules de DnaK de se lier.

Ce modèle permet également d'éclaircir la méthode employée par DnaK pour agir sur les polypeptides dès la sortie du ribosome en les protégeant. C'est pourquoi la RCMLA pourrait être utilisée pour mimer un polypeptide nouvellement formé, sans structure, dans un modèle comme celui-ci.



**Figure 1.12 : Modèle de l'action de « holdase » de DnaK.** Ce modèle explique comment serait réalisée la conservation du polypeptide en conformation dépliée. Ce type de complexe préviendrait l'aggrégation et la formation de structures erronées en plus d'assister le transfert de substrat ou son passage au travers de pores membranaires.

### 1.5.3 Objectifs de la recherche

Beaucoup de travail reste à faire sur les Hsp70s et plus particulièrement sur DnaK. Les principaux champs d'études actuels comprennent : la compréhension des éléments structuraux qui interviennent dans le mécanisme de transmission de la communication allostérique entre les deux domaines de DnaK, le discernement de l'état natif et dénaturé des substrats par la chaperonne à température physiologique ainsi que lors de chocs thermiques, les bases structurales et fonctionnelles de l'interaction entre DnaK et ses cofacteurs et la nature du mécanisme d'action de la chaperonne sur son substrat.

Les objectifs de ce mémoire se concentrent sur les thèmes généraux de la recherche d'un mode d'action de DnaK et de son interaction avec son substrat. Un modèle de substrat déplié, la RCMLA, sera utilisé pour vérifier l'hypothèse du mode d'action de « holdase ». Plus précisément, on procèdera dans l'ordre à la vérification des points suivants :

### **1. Y a-t-il un complexe spécifique qui se forme entre DnaK et la RCMLA?**

La première étape consiste à vérifier que le modèle utilisé convient pour l'étude. Un complexe composé des deux protéines, en proportions inconnues, doit exister. Les conditions de formation du complexe devront ainsi être déterminées, dans des expériences préliminaires. La spécificité de l'assemblage devra également être déterminée pour s'assurer que DnaK incorpore bien la RCMLA au site de liaison du substrat, éliminant ainsi la possibilité que le complexe soit un arrangement aléatoire constitué des deux protéines.

### **2. Le complexe est-il stable? Quelle est sa dynamique de dissociation?**

Une certaine stabilité du complexe est essentielle à la réalisation des expériences. Cependant, une très petite constante de dissociation serait incompatible avec l'hypothèse de départ puisqu'elle suggérerait que la chaperonne cède difficilement son substrat à une autre famille de chaperonne, ou qu'elle ne permet pas que le polypeptide se retire pour traverser un pore. Le modèle de « holdase » prédit qu'une telle association entre DnaK et la RCMLA est faible puisqu'elle est temporaire (80).

### **3. Quel est le rapport stoechiométrique des deux protéines?**

Différents ratios de chacune des protéines seront examinés afin d'observer le comportement du système. La base du modèle de « holdase » propose que plusieurs molécules de DnaK se lient sur un seul substrat pour provoquer un encombrement susceptible d'empêcher le repliement du polypeptide. Par titrage, le ratio molaire RCMLA/DnaK sera déterminé avec précision.

#### **4. Quels sont les sites de liaison de DnaK sur la RCMLA?**

L'identification des sites d'association de la chaperonne sur la séquence de la RCMLA permettra de caractériser ceux-ci. L'hydrophobicité, la taille et la position sur la chaîne polypeptidique des acides aminés seront étudiés et analysés. En comparant avec les recherches précédentes réalisées sur les peptides (section 1.4.3), la position exacte des résidus sera déduite.

## **CHAPITRE 2 :**

### **MÉTHODES EXPÉRIMENTALES**

#### **2.1 Techniques de préparation des échantillons**

Diverses méthodes de biologie moléculaire et de biochimie ont été utilisées pour obtenir les protéines en quantités suffisantes. La RCMLA était d'origine commerciale et nécessitait peu de manipulations, sa pureté était vérifiée par gel de polyacrylamide. DnaK, au contraire, devait être exprimée dans des cellules bactériennes puis purifiée. Afin d'augmenter le rendement de l'opération, des vecteurs de clonage contenant le gène de DnaK étaient insérés dans les bactéries, et des cellules compétentes étaient créées, ce qui permettait l'obtention de quantités allant jusqu'à 80mg de protéine par purification à plus de 97% de pureté.

##### **2.1.1 Préparation du plasmide et de cellules compétentes de *E. coli***

Le plasmide pTrcdnaK est fabriqué dans notre laboratoire à l'aide de l'ADNc codant pour le gène *dnaK* et du vecteur de transcription pTrc99A. Après amplification de l'ADNc à l'aide du PCR (Mastercycler gradient Eppendoff, Hamburg, Allemagne), diverses enzymes de restrictions sont utilisées sur le gène *dnaK* et sur pTrc99A. Par la suite, on mélange les constituants pour permettre la ligature du plasmide avec l'ADN étranger. Le plasmide contient le gène de résistance à l'ampicilline, allouant ainsi uniquement la croissance des bactéries ayant incorporé le plasmide.

La souche de cellules bactériennes électrocompétentes de source commerciale (Novagen, Allemagne) qui a été utilisée est *BL21*, un lysogène du phage *DE3*. Ce phage est un dérivé du phage  $\lambda$ , différant de celui-ci par l'insertion au niveau du gène *int* des gènes *lacI*, *lacZ*, du promoteur *lacUV5* et du gène de l'ARN polymérase de *T7*. Le promoteur *lacUV5* est induit par l'IPTG, ce qui permet une transcription du gène d'intérêt en très grande quantité.

Un litre de cellules bactériennes sont cultivées tel que décrit dans la section 2.1.2 jusqu'à une densité optique de  $A_{600nm}=0,5$ , mesurée par un colorimètre Philips PU-8625 (Philips analytical, Cambridge, Royaume-Uni). Les cellules sont alors laissées à incuber sur la glace durant 20 minutes. Une série de centrifugations/dilutions est alors effectuée en diminuant graduellement le volume de mixture eau distillée stérilisée et glycérol à 10% V/V dans lequel est dilué les cellules pour éliminer toute trace de bouillon de culture (8000rpm, 15 minutes, 4°C, de un litre à 3ml de solution de lavage) avec une centrifugeuse Avanti J-20XPI (Beckman coulter, États-Unis) et un rotor JA-10. Le rendement final de l'opération est typiquement de  $1 \times 10^{10}$  à  $3 \times 10^{10}$  cellules/ml. 40µl sont prélevés de la solution bactérienne et le reste est congelé en aliquotes avec de l'azote liquide et conservées à -70°C pour usage subséquent.

### **2.1.2 Insertion du plasmide dans les cellules compétentes par électroporation**

Une fois que le plasmide est préparé, et que les cellules compétentes ont été cultivées, il s'agit d'introduire le plasmide dans les cellules de *E. coli*. Dans une cuvette à électroporation de 1mm (Equibio, Ashford, Royaume-Uni) gardée à 4°C, sont déposés 5µl de solution du plasmide pTrcdnaK et 10µl de cellules électrocompétentes préparées tel que décrit à la section précédente. Par la suite, la cuvette est posée dans le compartiment de sécurité de l'électroporateur Electroporation System 650 (BTX Electroporation System, San Diego, États-Unis). L'appareil est réglé pour générer une décharge de 2,5kV (25µF) et le contrôleur de choc est positionné à 200Ω.

Immédiatement après la décharge, 1ml de bouillon de culture est ajouté à la cuvette, et les cellules sont suspendues dans le bouillon en pipetant délicatement la solution. On transfère alors les cellules dans un tube stérile où elles seront laissées à incuber durant 30 minutes. Finalement, le tout est centrifugé à 8000rpm pour 2 minutes dans une mini-centrifugeuse et diluées dans 100µl de bouillon de culture pour laver l'excédant de plasmide. Une plaque de pétri est préparée avec du LB-agar (1,5% p/v) et de l'ampicilline (0,1mg/ml) et les bactéries y sont étalées. On laisse incuber durant une nuit à 30°C.

### **2.1.3 Culture bactérienne de *E. coli***

Quatre colonies de la plaque obtenue sont transférées dans 4 erlenmeyers stériles de 100ml contenant chacun 35ml de bouillon de culture LB-broth (5g/l d'extrait de levure, 10g/l de caséine, 5g/l de NaCl, à pH 7,0) ainsi que de l'ampicilline à 0,1mg/ml. Les bactéries sont incubées à 37°C, sous agitation, durant une nuit jusqu'à saturation du milieu.

Une dilution (1/20) est alors effectuée en transférant la solution bactérienne dans des erlenmeyers plus grands contenant du bouillon de culture et de l'ampicilline dans des proportions égales à celles utilisées précédemment. On laisse croître la suspension cellulaire jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 0,7 à 600nm, ce qui correspond à la phase optimale de croissance. On ajoute alors 1mM d'IPTG et on laisse incubé à 37°C pour 4 heures afin d'optimiser la production de la protéine d'intérêt.

Les erlenmeyers sont retirés de l'incubateur et leur contenu est centrifugé avec un rotor JLA 9.1000 (8000rpm, 10 minutes, 4°C) pour en isoler un culot de cellules de *E. coli*. Pour DnaK, le culot est remis en solution avec 50ml de tampon constitué de 20mM Tris/HCl pH7,2 puis congelé à -20°C en attente de la purification de la protéine.

### **2.1.4 Purification de DnaK**

#### **2.1.4.1 Lyse des cellules**

D'abord, les cellules congelées sont dégelées en les mettant quelques minutes dans un bain gardé à 37°C. Par la suite, pour l'obtention d'un volume total de 100ml, les bactéries sont lysées en ajoutant 20mM Tris/HCl pH 7,2, 50mM NaCl, 2mM DTT, 0,1mg/ml de lysozyme et 1mM de EDTA. Le mélange est laissé sous agitation faible à 30°C pour 15 minutes pour assurer la lyse complète des cellules. Le tout est soniqué sur glace (à 4°C, 6 cycles de 30 secondes avec 20 secondes d'arrêt entre les cycles suivi par 6 autres cycles de 20 secondes en marche et 30 secondes de repos) dans le but de transformer les membranes en petites vésicules.

Une première séparation de protéines a lieu en récoltant le surnageant (dans lequel se retrouve DnaK) d'une ultracentrifugation (35000 rpm, 45 minutes, 4°C) avec une ultracentrifugeuse Beckman L8-50M/E (Beckman Coulter, États-Unis) et d'un rotor TFT 70.38, ce qui permet d'éliminer les particules ayant un coefficient de sédimentation élevé telles les ribosomes, l'ADN et les membranes plasmiques.

#### **2.1.4.2 Colonne d'échange ionique**

Le surnageant est chargé sur une colonne échangeuse d'anion Q-sepharose de 90ml préalablement équilibrée avec un tampon de 20mM Tris/HCl pH7,2, 50mM NaCl, 0,1mM EDTA, 2mM DTT. Un gradient de 4 volumes de colonne de 50 à 500mM de NaCl permet de déloger DnaK et d'éliminer un grand nombre de protéines. Des fractions de 10 ml sont recueillies à la sortie de la colonne, 5µl sont prélevés de chacune d'elles pour être chargés sur un gel SDS-PAGE à 12,5% d'acrylamide et déterminer ainsi les 10 fractions les plus pures et contenant la plus grande quantité de DnaK. Ces fractions sont jointes et 5mM de MgCl<sub>2</sub> y sont ajoutés. La solution est mise en agitation circulaire à 4°C pendant une nuit avec 8ml de résine d'ATP-agarose (Sigma, St.Louis, États-Unis) équilibrée avec un tampon A :20mM Tris/HCl pH7,2, 100mM NaCl, 0,1mM EDTA, 5mM MgCl<sub>2</sub>.

#### **2.1.4.3 Colonne d'ATP-agarose**

Le lendemain, l'agarose est montée dans une colonne et lavée avec 10 volumes de colonne de tampon A additionné de 2M de NaCl. Cette opération de lavage a pour but d'éliminer la RNase, qui se lie solidement à la colonne à une faible force ionique. La fraction contenant DnaK est délogée de la colonne par 5 volumes de tampon A auquel on a ajouté 5mM d'ATP. La présence de DnaK dans les fractions obtenues est vérifiée par électrophorèse. La solution est dialysée durant une nuit contre 2 litres de tampon contenant 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 15mM de β-mercaptoéthanol à pH 6,8.



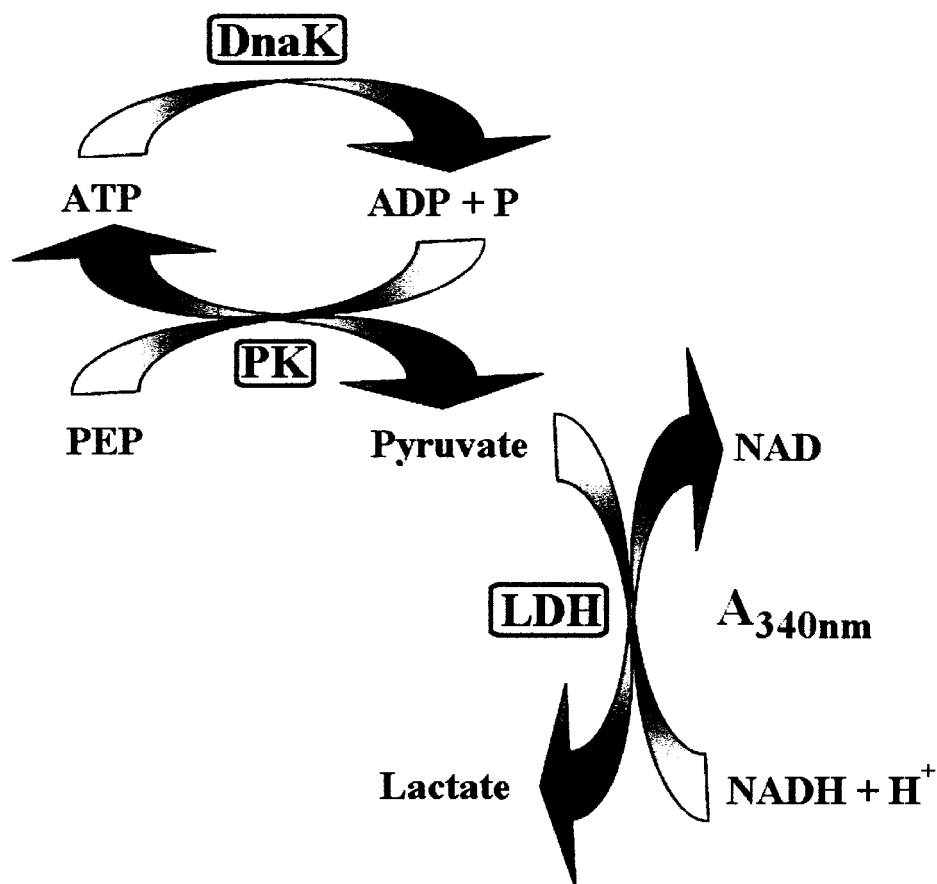
#### 2.1.4.4 Colonne d'hydroxyapatite

Une colonne d'hydroxyapatite est équilibrée avec ce même tampon de dialyse. Après injection de la solution de protéine, un gradient de 10 à 500mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  sur 10 volumes de colonne est utilisé pour terminer l'isolation de DnaK. Après vérification de la pureté de la protéine à l'aide d'un gel SDS-PAGE, on concentre DnaK avec un filtre Centriprep (Millipore, Bedford, États-Unis) dont les pores sont de 30kDa pour obtenir un volume final de un à deux ml. Pour éliminer le nucléotide qui s'est lié à DnaK lors de la purification, 4 dialyses consécutives d'un minimum de 12 heures chacun contre 2l de tampon composé de 20mM imidazole, 2mM EDTA et 10% glycérol à pH7,2, sont réalisées. Finalement, le tampon est changé par un autre (25mM HEPES, 50mM KCl, 5mM  $\text{MgCl}_2$  et 2mM DTT à pH7,6) par deux dialyses de 2l contre ce tampon. Des aliquotes de cette solution sont congelées avec de l'azote liquide et conservées à  $-20^\circ\text{C}$ .

#### 2.1.4.5 Échange de nucléotides et contrôle de qualité

Des contrôles d'activité de DnaK permettent de vérifier la qualité de la purification. D'abord, on doit s'assurer que le nucléotide lié a été complètement éliminé. Dans cette optique, le rapport d'absorbance  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  est mesurée sur un spectrophotomètre Cary 3 Bio (Varian, Victoria, Australie). On estime généralement que ce rapport doit être de 0,7 ou moins pour considérer que l'opération a été efficace puisque l'ATP absorbe beaucoup à 260nm, alors que la longueur d'onde maximale d'absorbance de DnaK seule est à 280nm.

Aussi, la mesure de l'activité du domaine ATPase de DnaK permettra une vérification rapide et facile de la qualité de la purification. La méthode spectrophotométrique employée est une cascade enzymatique qui mesure ultimement l'absorbance à 340nm de la transformation du NADH en NAD (figure 2.1) (81). D'abord, on prépare un mélange contenant les enzymes et les réactifs qui poursuivront la chaîne de réaction après celle impliquant DnaK. Dans un tampon contenant 40mM HEPES, 50mM KCl et 11mM Mg-acétate à pH 7,6, on met en solution 0,2mM de



**Figure 2.1 : Réactions permettant de mesurer l'activité du domaine ATPase de DnaK.** L'activité ATPasique de DnaK transforme l'ATP en ADP et phosphate inorganique. La pyruvate kinase (PK) utilise l'ADP ainsi obtenu pour transformer le phosphoenolpyruvate (PEP) en pyruvate. Le lactate est alors produit par la lactate deshydrogénase avec son substrat, le pyruvate, dont la synthèse relève de l'activité d'ATPase de DnaK. Cette dernière réaction consomme du NADH, qui absorbe fortement à 340nm, et dégage du NAD, qui absorbe très peu. Par conséquent, mesurant la diminution de l'absorbance à 340nm, il est possible de calculer l'activité d'ATPase de DnaK.

NADH, 2mM de phospho énoypyruvate (PEP), 12,5ng/ml de pyruvate kinase (PK) et 25ng/ml de lactate deshydrogénase.

Le spectrophotomètre Cary est muni d'un régulateur de température qu'on utilise dans cette expérience pour garder la température à 30°C tout au long de la mesure

cinétique. La solution d'enzymes et de réactifs est incubée 5 minutes dans une cuvette de parcours optique de 1cm, on vérifie que l'absorbance ne change pas durant ce temps. 1mM d'ATP est ajouté, l'absorbance à 340nm diminue légèrement par cette injection mais se stabilise rapidement. 5 $\mu$ M de DnaK est alors incorporé et la variation d'absorbance est enregistrée sur une période de 20 minutes suivant son injection.

La vitesse d'hydrolyse de l'ATP se mesure en unités de moles d'ATP par minute, et se détermine à partir de la pente d'un graphique de l'absorbance en fonction du temps, que l'on divise par la différence des coefficients d'extinction ( $\epsilon_{340nm,NADH} - \epsilon_{340nm,NAD} = 6220M^{-1}$ , pour un parcours optique de 1cm), et par la concentration molaire de DnaK.

Puisque DnaK est un enzyme allostérique pour lequel la liaison d'un substrat augmente l'efficacité du domaine ATPasique, une dernière vérification de l'activité de DnaK est mesurée avec un substrat reconnu de DnaK. Ainsi, après les 20 minutes d'enregistrement de l'absorbance à 340nm avec DnaK seul, 500 $\mu$ M d'un court peptide de séquence NRLLLTG (peptide nR) est inséré dans la cuvette, pour lequel la présence sur le site de liaison du substrat a été démontrée par cristallographie et diffraction de rayons X (30). L'absorbance à 340nm diminue alors plus rapidement que sans ce peptide. En comparant les pentes de l'absorbance en fonction du temps avec et sans peptide, on s'assure aussi de l'intégralité du domaine de liaison du substrat de DnaK. Les pentes doivent être dans un rapport de 1 / 4,5-5,0 sans nR / avec nR pour considérer que la protéine est intacte (82).

### **2.1.5 Marquage de la RCMLA par le fluorophore FITC**

Comme précisé précédemment, la lactalbumine lyophilisée carboxy-méthylée sur les cystéines était obtenue de Sigma (St-Louis, MO, États-Unis). Cependant, pour plusieurs expériences, la RCMLA marquée à l'extrémité N-terminale par une molécule de FITC était nécessaire. Ce court protocole permet de préparer 5mg de RCMLA-FITC, à un rapport d'une molécule de FITC par RCMLA.

Une quantité de 5mg de RCMLA sont dilués dans un tampon 1M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8 pour l'obtention d'une concentration protéique de 2,5mg/ml. La solution du fluorophore composée de 0,5mg de FITC dissous dans 70µl de DMSO anhydre est ajoutée et préparée immédiatement avant le mélange. Dès que FITC est en solution, toutes les manipulations se font dans des tubes opaques ou recouverts de papier d'aluminium puisque la fluorescéine se détériore à la lumière. La mixture est laissée 4 heures sous agitation lente à la température de la pièce afin de permettre une liaison maximale des molécules de FITC à celles de RCMLA. À la fin de cette période, on considère que tout la RCMLA est marquée puisque le FITC était en large excès, il ne reste donc que le complexe et la FITC libre à séparer. À cette fin, on utilise une colonne de tamis moléculaire PD-10 (Amersham biosciences, Buckinghamshire, Angleterre), remplie de Sephadex G-25, équilibrée avec le tampon de bicarbonate et on injecte l'échantillon. Deux bandes de couleur jaunes apparaissent sur la colonne et la première à en sortir est recueillie puisqu'elle correspond au complexe RCMLA-FITC.

Afin de vérifier le ratio RCMLA/FITC, qui devrait être de 1, l'absorbance à 280nm et à 494nm est enregistrée à l'aide du spectrophotomètre Cary 3 Bio. La RCMLA absorbe à 280nm, grâce à ses résidus aromatiques, avec un coefficient d'extinction de  $\epsilon_{280,RCMLA} = 28\,540\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  (76). Le fluorophore FITC absorbe fortement à 494nm,  $\epsilon_{494,FITC} = 68\,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  (71), mais absorbe aussi à 280nm, quoique 3,33 fois moins qu'à 494nm. Pour trouver la concentration de RCMLA, on substitue les résultats d'absorbance dans l'équation suivante :

$$A_{280,RCMLA} = A_{280,TOTAL} - 0,30 (A_{494,FITC}) \quad (1)$$

## **2.1.6 Mesures de concentration protéique**

### **2.1.6.1 Quantification protéique par la méthode de l'absorbance ultraviolette**

Cette méthode possède l'avantage d'être rapide et de demander peu de manipulations. Cependant, la quantité de protéine nécessaire à l'obtention d'un bon signal n'est pas négligeable et elle doit être dans un volume important (au moins 400µl, dépendant des cuvettes disponibles). Elle est peu recommandée si l'échantillon mesuré

de cette façon ne peut pas être utilisée pour l'expérience elle-même. Ce sont essentiellement les résidus aromatiques qui absorbent dans l'ultraviolet, si la protéine en est dépourvue, la méthode n'est plus très précise. Avec un résultat de l'absorbance à 280nm, on découvre directement la concentration par l'équation de Beer-Lambert :  $A_{280} = \epsilon Cl$ .  $l$  est le parcours optique de 1cm,  $C$  est la concentration protéique inconnue, et  $\epsilon_{280}$  est le coefficient d'extinction à 280nm de la protéine, qui est de  $15800\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  (83) pour DnaK.

#### **2.1.6.2 Quantification protéique par la méthode de Bradford**

La méthode de Bradford (84) se distingue de celle par absorbance dans l'ultraviolet par sa capacité à détecter de faibles quantités de protéine (aussi peu que  $0,2\mu\text{g}$  dans un volume jusqu'à  $80\mu\text{l}$ ) et par une reconnaissance d'un plus grand nombre de protéines puisque plusieurs acides aminés interagissent (arginine, histidine, lysine, tyrosine, tryptophane et phenylalanine) (85). Le principe est simple : du bleu de Coomassie G-250 est ajouté à la solution protéique dans des conditions de pH acide et il se lie par des interactions non-covalentes aux acides aminés, ce qui change son maximum d'absorbance de 465nm (rouge) à 595nm (bleu).

Une courbe-étalon est réalisée à chaque détermination de concentration avec de l'albumine bovine (BSA) (Sigma, St-Louis, États-Unis) entre  $0\mu\text{g}$  et  $16\mu\text{g}$ , dissoute dans le même tampon que celui de l'échantillon pour obtenir un volume de  $100\mu\text{l}$  pour chacun des tubes.

Pour chaque tube, 1ml du réactif de Bradford (Pour un litre ; 0,1g de Coomassie Brilliant Blue G-250, 50ml d'éthanol, 100ml d'acide phosphorique 85%) est ajouté à la solution de protéines. Un temps d'attente de 10 minutes est requis avant de mesurer l'absorbance à 595nm.

## 2.2 Électrophorèses de protéines

### 2.2.1 Gel de SDS de 12,5% d'acrylamide

Ces gels sont ceux qui servaient lors de la purification de DnaK et des expériences préliminaires. Dans ces cas, les échantillons étaient mélangés avec un tampon de charge (25mM Tris pH 6,8, SDS 4% p/v, glycérol 4% p/v, bleu de bromophénol 0,02% p/v, DTT 100mM) dans un rapport de 1/1 v/v. Par la suite, les échantillons sont portés à 100°C durant 5 minutes pour s'assurer que le SDS est bien réparti dans la protéine dépliée. Des marqueurs de poids moléculaire sont déposés dans l'un des puits ; ils sont préparés avec 17µl de tampon de charge, 2µl de DTT 1M et 1µl de solution de protéines standard (Broad marker, Bio-rad, États-Unis).

Le gel de séparation est obtenu en combinant 1,25ml de Tris 3M pH 8,8, 100µl de SDS 10%, 4,9ml d'un mélange d'acrylamide/bisacrylamide 30/0,8 et 4,50ml d'eau distillée. Immédiatement avant de couler le gel, on ajoute 40µl de persulfate d'ammonium (APS) à 10% et 15µl de TEMED pour faire polymériser l'acrylamide. Après avoir coulé le gel, un volume de l'ordre de 1ml d'isopropanol est déposé sur le gel avant sa gélification afin d'assurer que le gel reste au même niveau sur toute sa largeur. L'isopropanol étant plus léger que la solution du gel de séparation, il reste à la surface pendant que le gel se solidifie, pour être retiré lorsque sa fonction est terminée. Le gel de compression sert à affiner la définition des bandes, il a une teneur moins élevée en acrylamide, on le fait à 4,7%. Les constituants du mélange sont les suivants : 2,5ml de Tris à 0,5M, pH 6,8, 100µl de SDS 10%, 1,5ml de la solution d'acrylamide et 5,85ml d'eau distillée. La solution est solidifiée par 100µl d'APS 10% et 15µl de TEMED.

Les électrodes sont immergées dans un tampon formé de Tris 25mM, pH 8,3 contenant 200mM de glycine et 1% SDS. Le voltage est réglé à 100V lorsque les protéines sont dans le gel de compression puis est élevé à 200V lorsque le front atteint le gel de séparation.

### **2.2.2 Gel de Tris-tricine à 16,5% d'acrylamide**

Les gels de Tris-tricine à 16.5% d'acrylamide permettent une plus grande résolution au niveau des protéines très petites et des polypeptides. On peut y résoudre des bandes correspondant à des polypeptides d'une taille aussi petite que 1000Da, ce qui correspond à environ 10 acides aminés. Ces gels ont été utilisés pour faire l'étude des fragments de RCMLA (la protéine entière ne pèse que 14kDa) générés sur la trypsine. Les supports des gels utilisés lors de cette expérience étaient aussi plus longs que les autres pour favoriser au maximum la résolution des bandes.

Le gel de séparation était formé de 3,33ml de tampon concentré (3M Tris, pH 8,45 avec SDS à 0,3%), 1g de glycérol, 3,33ml d'acrylamide/bisacrylamide 49,5/3, 3,3ml d'eau distillée, 33,3 $\mu$ l d'APS 10% et 3,33 $\mu$ l de TEMED ajouté immédiatement avant de couler le gel. Le gel de compression contient 1ml de tampon concentré, 0,33ml de solution d'acrylamide, 2,63ml d'eau distillée, 30 $\mu$ l d'APS 10% et 3 $\mu$ l de TEMED. Ces gels diffèrent aussi des précédents par des tampons différents à l'anode et à la cathode. L'anode baigne dans un tampon 0,1M Tris pH8,9 et la cathode est placée dans un tampon de 0,1M Tris, pH 8,25, 0,1M Tricine et 0,1% de SDS. Un gradient de potentiel est appliqué, de 50V à 250V, sur une période de 3 heures, puis le voltage est laissé à son maximum pour le reste de la migration.

### **2.2.3 Gel en gradient d'acrylamide**

Ces gels permettent de révéler les bandes correspondant à des protéines dans une plus grande gamme de poids moléculaires. Ils ont été utilisés dans la partie du travail impliquant des agents pontants puisqu'il était important de distinguer la RCMLA (14kDa), DnaK (69kDa) et un complexe d'un poids supérieur à 73kDa. Le plus grand désavantage de cette technique est que les bandes ne peuvent pas être associées à un poids moléculaire. En effet, la distribution des standards par rapport à la distance de migration n'est pas logarithmique comme dans les autres gels mais obéit à une fonction plus complexe, rendant impossible l'identification. Les standards fournissent donc un support seulement approximatif de la taille des protéines et de leurs complexes.

Pour faire le gradient, on prépare deux solutions identiques à celles de la section 2.2.1 sauf que le pourcentage d'acrylamide y est modifié à 5% et à 20%, la différence de volume occasionnée est compensée par du tampon concentré et de l'eau distillée. Le volume des 2 solutions doit être rigoureusement identique, et le volume total doit correspondre à celui désiré pour le gel de séparation. Un appareil constitué de deux réservoirs (chacun d'eux contiendra l'une des solutions de concentration d'acrylamide différentes) connectés par un tube muni d'une valve est utilisé pour couler le gel (figure 2.2). L'appareil est installé sur une plaque magnétique et des agitateurs permettront de brasser le contenu des réservoirs. Immédiatement avant de verser les solutions, l'APS et le TEMED sont ajoutés. L'ouverture simultanée des valves permet de couler un gel contenant un gradient de 20% d'acrylamide dans le bas du gel à 5% à la jonction avec le gel de compression. Ce dernier, ainsi que le tampon appliqué aux électrodes sont préparés de la même façon qu'à la section 2.2.1.

#### **2.2.4 Gels natifs**

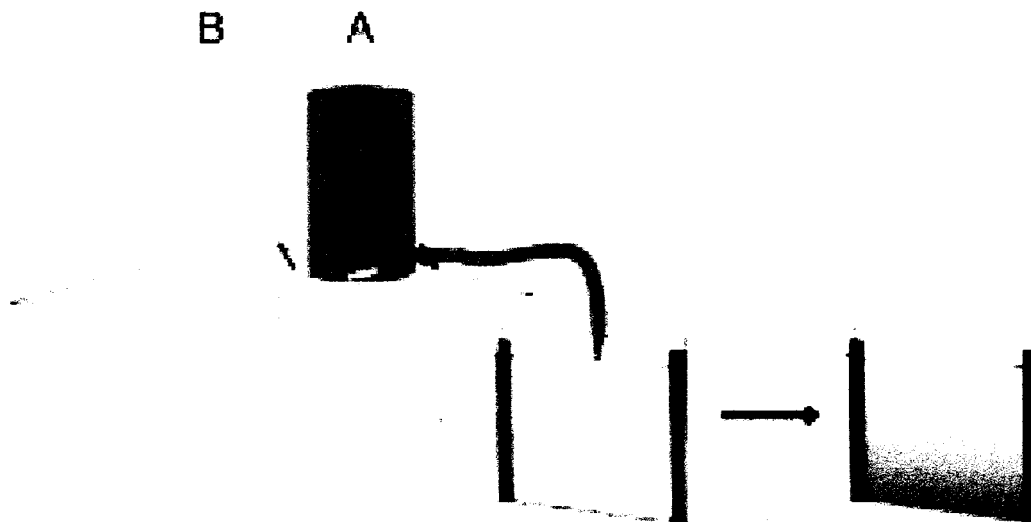
Les gels natifs permettent la séparation des protéines selon leur taille sans les dénaturer, ils sont donc particulièrement utiles pour l'étude des complexes protéiques. La migration des protéines et le développement des gels se font à l'aide d'un appareil PhastSystem (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Angleterre) qui fait un gradient de potentiel automatisé. Les gels sont achetés (PhastGel separation media, gradient 8-25% d'acrylamide) du même fournisseur. Outre l'acrylamide, ils sont composés de 0,112M Tris, pH 6,4 et 0,112M d'acétate. Fournis avec les gels, les tampons des gels natifs ne contiennent pas de SDS, ils sont de 0,25M Tris, pH 8,8 et 0,88M de l-alanine.

#### **2.2.5 Révélation des bandes sur le gel**

##### **2.2.5.1 Coloration au bleu de Coomassie**

La coloration des gels est réalisée avec une solution contenant 0,1% de Coomassie Brilliant Blue R-250, 40% de méthanol et 10% d'acide acétique glacial. Les gels sont maintenus dans cette solution pendant 1 heure à la température ambiante et





**Figure 2.2 : Schéma du montage permettant de former un gradient d'acrylamide.**  
 La solution A contient une solution à 20% d'acrylamide et la solution B est à 5% d'acrylamide. Les tubes laissent aller lentement leur contenu par l'effet de la gravité, les solutions se mélangent pour former un gradient.

sous agitation. Par la suite, la solution de coloration est retirée pour décolorer le gel où il n'y a pas de bandes avec une solution composée de 40% de méthanol et de 10% d'acide acétique glacial. Cette solution est changée plusieurs fois pour retirer tout le bleu de Coomassie en excès. Finalement, les gels sont rincés à l'eau avant d'être séchés.

#### **2.2.5.2 Coloration au nitrate d'argent**

La coloration à l'argent possède une limite de détection des protéines très basse, elle alloue la visualisation de bandes invisibles par une coloration au bleu de Coomassie. Tout le matériel doit être d'une propreté parfaite puisque la haute sensibilité de la méthode provoque des taches sur le gel à la moindre impureté. Le gel à développer est d'abord lavé à l'eau nanopure plusieurs fois, puis, une solution de 50% de méthanol,

10% d'acide acétique et 0,25% de glycérol est utilisée pour fixer les protéines. Une série de lavages à l'eau permettent d'éliminer toutes les traces de la solution de fixation. La coloration est générée à l'aide du kit de coloration Silver stain plus, de Bio-Rad (Californie, Etats-Unis), selon les instructions du fabricant.

### **2.2.5.3 Révélation des bandes par le transilluminateur à ADN**

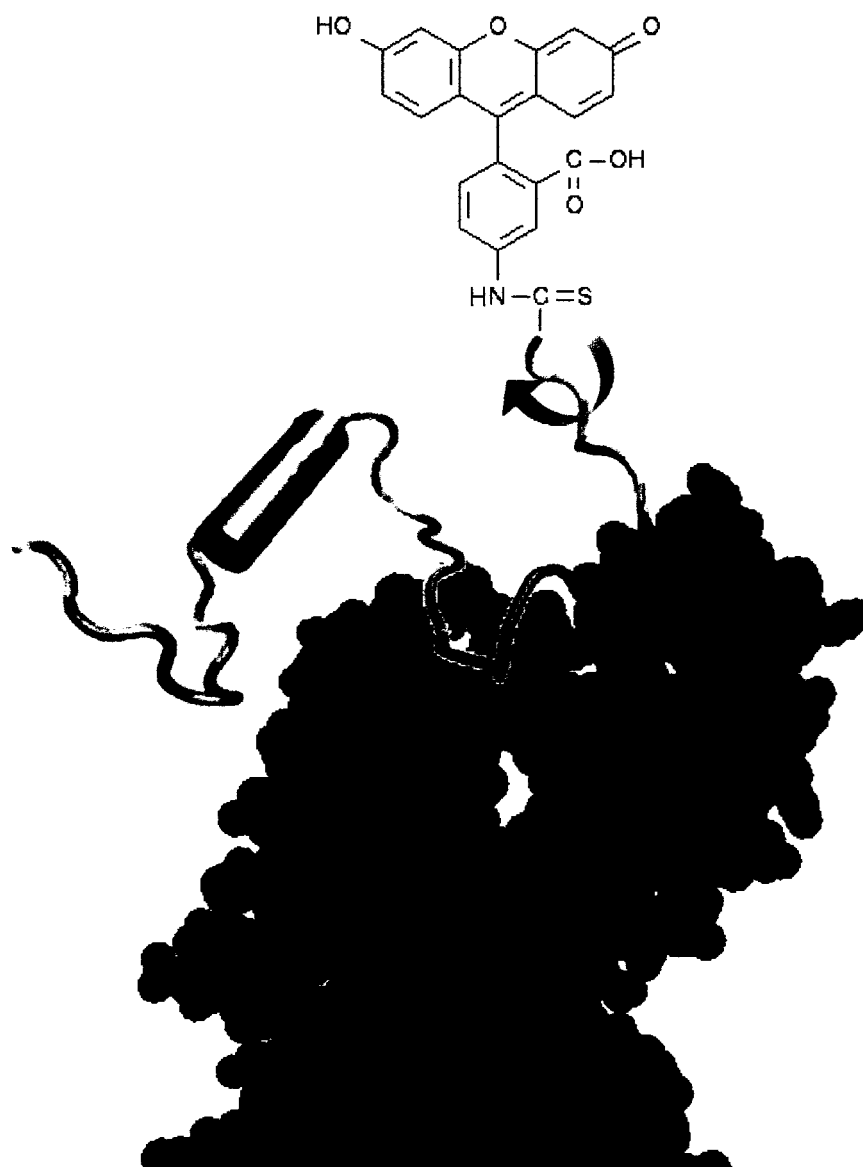
L'appareil se règle pour détecter la fluorescence de différents spectres excitation/émission, dont l'un recoupe en partie celui de FITC. Malgré le faible signal engendré (la luminosité et le contraste de la photo des figures 3.7 (b) et 3.8 (b) ont été ajustés à l'aide de logiciels informatiques), les bandes apparaissant sur la photo sont spécifiques et exclusives à la FITC-RCMLA, puisque aucune autre espèce fluorescente n'a été ajoutée aux échantillons.

## **2.3 Appareils et mesures biophysiques**

### **2.3.1 Anisotropie de fluorescence**

La fluorescence est une technique spectroscopique basée sur la particularité de certaines molécules, les fluorophores, à passer d'un état excité de haute énergie à un état électronique fondamental d'énergie moindre. La différence d'énergie est dissipée sous forme de lumière. Le phénomène d'anisotropie de fluorescence tient son origine dans la probabilité qu'une molécule puisse opérer une rotation entre le moment où elle est excitée et celui où elle se désactive par émission de fluorescence.

L'anisotropie de fluorescence permet donc d'observer la mobilité du fluorophore. Les mesures d'anisotropie de fluorescence mettent ainsi en évidence le déplacement angulaire moyen du fluorophore qui se produit entre l'absorption et l'émission d'un photon. Cette méthode a été employée pour caractériser l'interaction de RCMLA avec DnaK. La RCMLA étant marquée à une extrémité par une molécule de FITC, les libertés de mouvement du fluorophore et du polypeptide deviennent directement couplées (figure 2.3). Plus la particule est grande, moins importante sera la diffusion rotationnelle, ce qui se traduit en une hausse de l'anisotropie. La formation d'une



**Figure 2.3 : La RCMLA marquée perd de la liberté de mouvement lorsque liée à DnaK.** La RCMLA à laquelle une molécule de FITC est liée à l'extrémité N-terminale est moins mobile lorsque l'une de ses régions est attachée à la chaperonne. Ainsi, lorsque le complexe est formé, la liberté de mouvement baisse et l'anisotropie de fluorescence augmente.

liaison avec DnaK restreint encore plus la mobilité de la RCMLA. Par conséquent, l'anisotropie augmente lorsque RCMLA est en complexe avec DnaK.

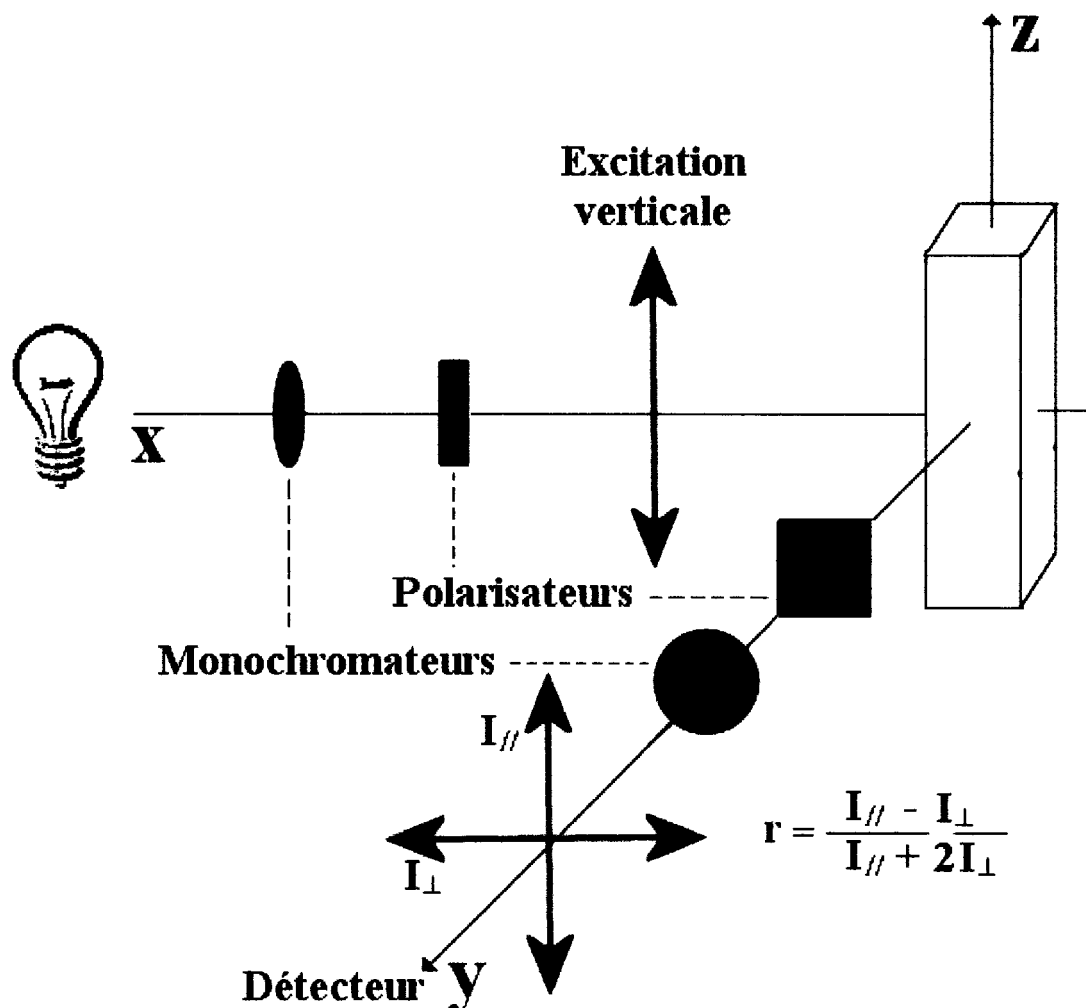
Les mesures d'anisotropie de fluorescence sont réalisées sur un spectrofluorimètre modulaire SLM8100 Aminco (Newport, Maryland, Etats-Unis) en fixant la longueur d'onde d'excitation à 494nm et celle d'émission à 517nm. Le trajet décrit dans l'appareil par l'onde lumineuse est schématisé à la figure 2.4. L'appareil est muni d'un bain régulateur de la température et d'un thermocouple permettant de mesurer la température avec précision. Un agitateur magnétique est aussi placé sous la cuvette pour les expériences nécessitant un mélange continu. Les fentes de l'appareil sont réglées à 4nm, ce qui assure une bonne intensité du signal et une résolution adéquate.

### **2.3.2 Chromatographies d'exclusion de taille**

Dans ce type de chromatographie, les particules les plus grandes sont les premières à sortir de la colonne alors que les plus petites molécules tardent davantage à se libérer puisqu'elles se glissent dans tous les interstices de la matrice de la colonne. Il est possible de garder un complexe non-covalent natif dans ce type de support à chromatographie pour toute la durée de l'expérience mais l'inconvénient est que la séparation est réalisée sur la base de la forme plutôt que du poids. Ainsi, une particule longue mais fine sera retenue beaucoup plus longtemps qu'elle ne le devrait si seulement sa masse entrainait en jeu.

Pour caractériser le complexe RCMLA/DnaK, on a utilisé une colonne BioSilect 400 (Bio-Rad, Etats-Unis), remplie d'un gel à base de groupes silanols ( $\text{Si}_n\text{O}_{2n}$ ) en particules de formes irrégulières. Afin d'éviter une adhésion excessive des protéines sur les billes du gel et favoriser ainsi leur élution, un tampon de force ionique trois fois supérieure à celle généralement employée est utilisé (Tris 60mM, pH 7,0, KCl 150mM,  $\text{MgCl}_2$  15mM, ADP 0,4mM, DTT 1mM).

Pour mesurer l'absorption des protéines éluées à différentes longueurs d'onde et pour collecter des fractions de façon automatisée, un appareil Akta chromatography PH/C10 (Amersham biosciences, Angleterre) est utilisé. Un détecteur d'absorbance



**Figure 2.4 : Schéma simplifié du trajet lumineux suivi dans un spectrofluorimètre mesurant l'anisotropie.** La lumière est d'abord filtrée, ne laissant passer qu'une longueur d'onde précise, puis polarisée. La lumière arrivant à l'échantillon est donc monochromatique et polarisée verticalement. La substance fluorescente renvoie une lumière dont on mesurera, à la longueur d'onde d'émission programmée, l'intensité de la composante verticale et de la composante horizontale. L'anisotropie ( $r$ ) est donnée par l'équation indiquée sur la figure.

dans la région du UV-visible est installé et peut mesurer l'intensité à travers une cellule de 1cm de parcours optique à la sortie de la colonne à 3 longueurs d'ondes simultanément.

### 2.3.3 Titrage calorimétrique isotherme (ITC)

Le titrage calorimétrique isotherme (Isothermal Titration Calorimetry) permet d'obtenir les paramètres thermodynamiques qui décrivent l'interaction entre deux molécules. L'instrument est formé de deux puits identiques fabriqués d'un matériel conducteur de chaleur, généralement en or ou en un alliage de nickel, entourés d'un recouvrement permettant un contrôle adiabatique (figure 2.5). La macromolécule est insérée dans un des puits muni d'un dispositif d'injection et le ligand est introduit de façon contrôlée dans des conditions d'agitation vigoureuse. La cellule de référence, rigoureusement identique à celle contenant l'échantillon, est remplie d'eau distillée nanopure et dégazée dans laquelle est appliquée une faible décharge électrique (de moins de 1mV) dont l'énergie sera utilisée pour créer la référence de base de la mesure. Ce signal est enregistré par l'appareil, qui régule par la suite le circuit qui équilibre la différence de chaleur entre la cellule de référence et la cellule contenant l'échantillon.

La mesure d'ITC obtenue représente le voltage requis, en fonction du temps, pour garder la température égale dans les deux puits tout au long du titrage. Le ligand est injecté graduellement afin de permettre un équilibre aussi constant que possible. La chaleur dégagée ou absorbée pendant l'injection du ligand dans la cellule contenant la macromolécule dépend de la nature exothermique ou endothermique de l'interaction moléculaire. La différence de chaleur observée est proportionnelle à la fraction de ligands s'étant associés, il est donc essentiel de déterminer avec justesse la concentration initiale du titrant et du titré (et leur volume) pour détenir une précision acceptable au niveau des paramètres thermodynamiques.

Les mesures d'interaction entre les protéines ne doivent pas dépendre de l'énergie de solvation du ligand, des produits présents dans le tampon et des autres phénomènes physiques indépendants de l'association des protéines. On élimine ces effets par un enregistrement de l'injection du ligand dans la cellule remplie de tampon dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la mesure de l'interaction entre les protéines. Par la suite, la courbe du voltage en fonction du temps pour le tampon est

soustraite de celle pour laquelle la cellule contenait la macromolécule. L'une des hypothèses sous-jacente à la technique est que les sites de liaison du ligand sur la macromolécule sont tous équivalents.

À partir du voltage, on obtient en une seule expérience la constante de dissociation ( $K_d$ ), la stoechiométrie de la réaction ( $n$ ) et l'enthalpie ( $\Delta H$ ) de l'interaction. La différence de potentiel mesurée en fonction du temps est facilement convertible en puissance (énergie/temps) par la loi d'Ohm, puisque l'intensité du courant reste constante durant toute la durée de l'expérience. La puissance en fonction du temps est présentée sur un graphique d'ITC, dans la partie du haut. Pour l'obtention du graphique de l'enthalpie par rapport au ratio molaire titrant/macromolécule, on doit transformer les valeurs de temps en quantité de molécules. Comme on connaît exactement la quantité de macromolécule présente dans la cuvette et celle du ligand injecté, la conversion est très simple. L'équation qui servira à définir la courbe liant les points du graphique de l'enthalpie par rapport au ratio molaire dépend du système étudié. L'équation utilisée pour caractériser la liaison de RCMLA à DnaK est la suivante :

$$\Delta H = \frac{\left( \frac{[RCMLA]}{[DnaK]} \right)^n}{K_d^{-1} + \left( \frac{[RCMLA]}{[DnaK]} \right)^n} \quad (2)$$

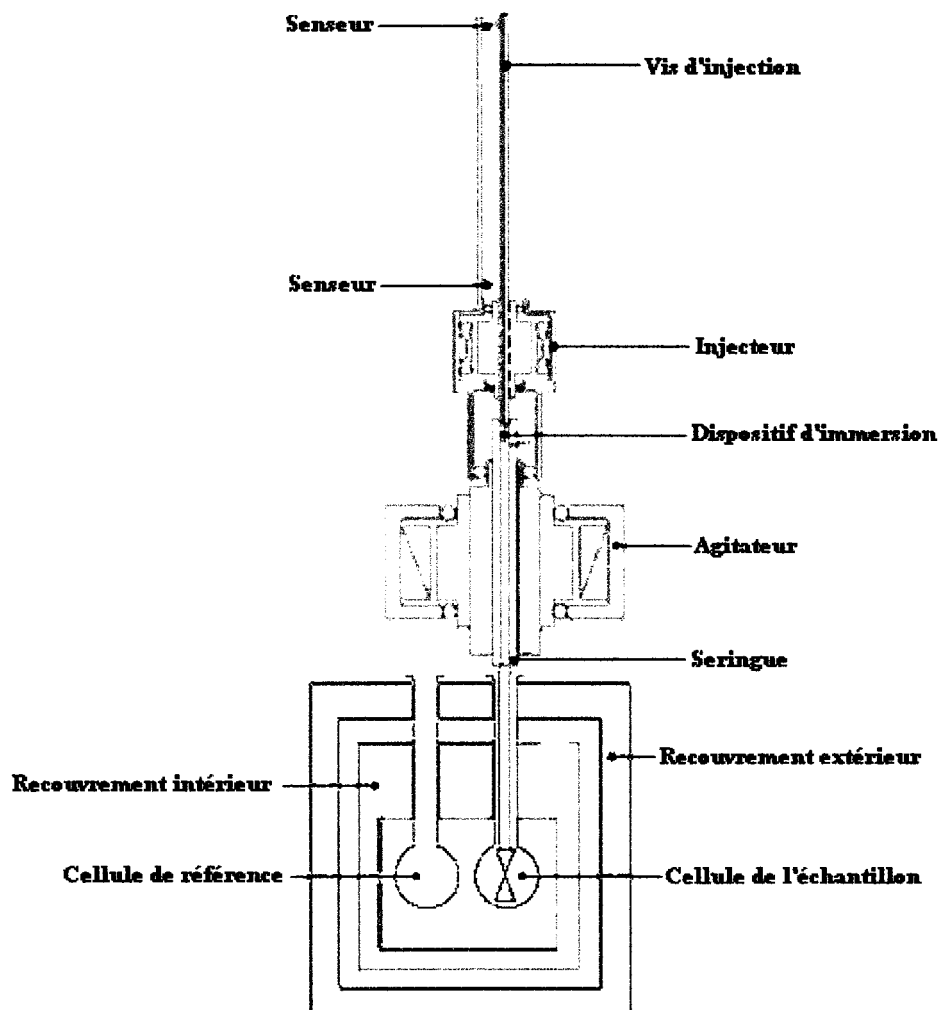
La constante de dissociation et le nombre de sites de liaison  $n$  sont donc trouvés directement par l'équation.

L'énergie libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) et l'entropie ( $\Delta S$ ) sont déterminées indirectement à partir du  $\Delta H$  et du  $K_d$  mesurés expérimentalement. On les calcule à l'aide des deux équations suivantes :

$$K_d = \exp\left(\frac{-\Delta G}{RT}\right) \quad (3)$$

$$\Delta S = \frac{\Delta G - \Delta H}{T} \quad (4)$$

Où  $T$  est la température, constante tout au long de l'expérience. Toutes les incertitudes sur les calculs sont déterminées par la méthode différentielle.



**Figure 2.5 : Schéma du dispositif d'injection dans la cellule de l'échantillon à l'intérieur d'un calorimètre ITC.** L'injecteur est muni d'une vis tournante permettant l'ajout de faibles quantités de ligand. Au bout de l'injecteur est placé un agitateur mécanique permettant un mélange immédiatement après l'injection du ligand. Les recouvrements des cellules permettent un contrôle complètement adiabatique de l'échantillon.

Avec plus d'une mesure à différentes températures, on peut aussi tracer le graphique de la variation de l'enthalpie en fonction de la température, dont la pente nous renseignera sur la variation de la capacité calorifique à pression constante ( $\Delta C_p$ ) de la réaction.



Les expériences d'ITC sont réalisées sur un microcalorimètre VP-ITC (Microcal Northampton, Etats-Unis). Les protéines sont d'abord dialysées contre un tampon PIPES 20mM, pH 7,0, KCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM. Les échantillons sont alors centrifugés pour éliminer la présence possible d'agrégats et les concentrations protéiques sont déterminées par les méthodes décrites à la section 2.1.6. Par la suite, 1mM de TCEP et 1mM d'ADP sont ajoutées à l'échantillon et les concentrations sont calculées en fonction du volume ajouté. Le titrage des protéines et la dilution du ligand sont enregistrés le même jour et soustraites à l'aide du programme Origin 7.0, fourni avec le calorimètre.

Pour l'ajustement des mesures de variation de chaleur d'une microinjection à l'autre, on utilise un modèle d'interaction avec des sites de liaison non séquentiels. On considère que les sites de liaison de DnaK sur la RCMLA se dévoilent en partie grâce à l'exposition des autres et que le temps requis pour combler les sites subséquents au premier lié est minime. L'équation utilisée pour décrire la différence d'enthalpie lors d'une injection  $i$  est la suivante :

$$\Delta Q(i) = Q(i) + \frac{dV_i}{V_o} \left[ \frac{Q(i) + Q(i-1)}{2} \right] - Q(i-1) \quad (5)$$

où  $\Delta Q(i)$  est la variation de chaleur due à l'interaction entre les molécules,  $Q$  est la chaleur provoquée par l'injection,  $V_o$  est le volume initial dans la cellule et  $V_i$  est le volume total à l'injection  $i$ .

#### 2.3.4 Spectroscopie de masse

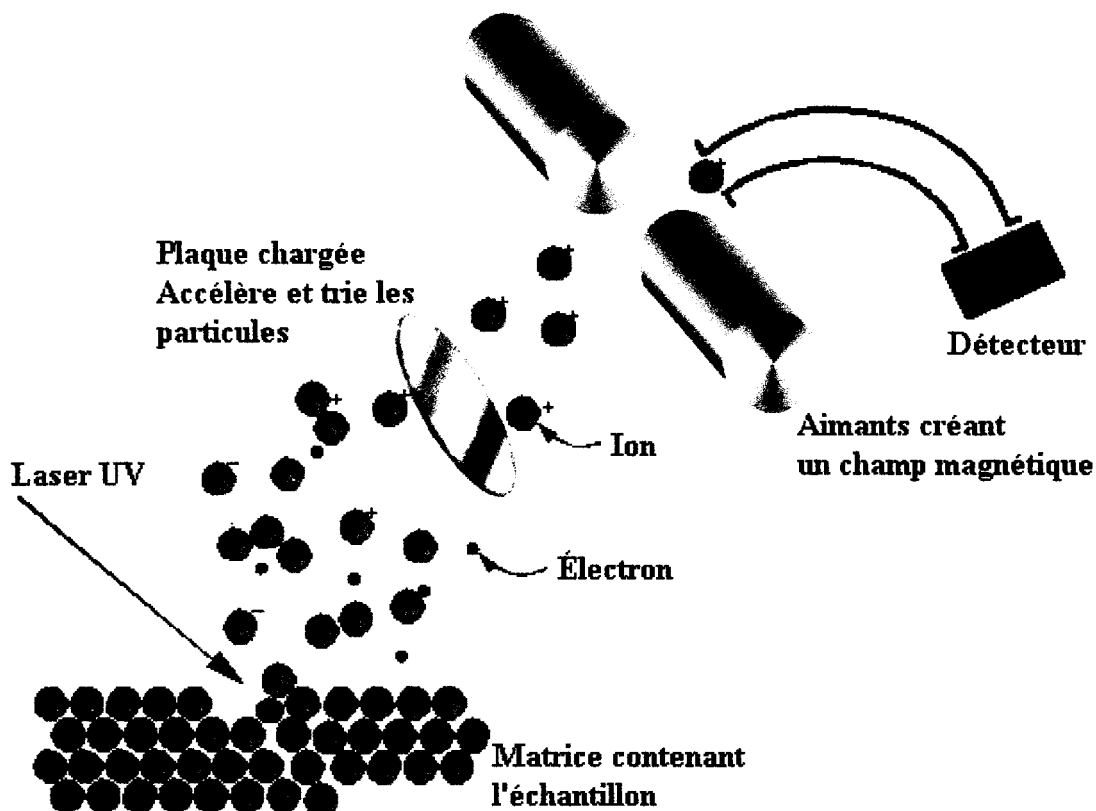
La spectroscopie de masse est une méthode qui révèle avec une grande précision la masse des molécules ionisées selon leur relation charge/masse ( $m/z$ ). En plus du poids moléculaire du composé, cette technique peut révéler la structure chimique de la molécule. Dans le cas des applications en biologie impliquant des macromolécules, on

doit fragmenter la protéine avant de l'ioniser pour en réduire la taille. Ce handicap peut être transformé en avantage puisque chaque fragment ionique sera détecté avec sa propre valeur de  $m/z$ , on aura donc la taille et le degré d'ionisation de chaque segment. Pour générer des fragments à partir d'un polypeptide, on utilise une protéase dont l'action est limitée à certains acides aminés, telle la trypsine qui ne rompt le lien peptidique qu'au niveau des lysines et des arginines.

Les protéines analysées au service de spectroscopie de masse de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU), avec un spectromètre de masse Bruker, Uktraflex TOF/TOF (Bruker-Daltonics, Bremen, Allemagne), avaient déjà été fragmentées lors des manipulations antérieures à la préparation de l'échantillon pour la spectroscopie de masse. Pour l'ionisation et la vaporisation, la méthode de MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) a été employée. Le procédé utilise un laser de lumière UV pour désorber des macromolécules de la matrice. Lors de l'absorption UV, les molécules inconnues sont détachées de la matrice et une fraction de celles-ci est ionisée.

Par la suite, les ions désorbés sont accélérés en passant par une grille chargée générant un champ électrique (figure 2.6) pour ensuite passer dans un champ magnétique qui les dévie sur le détecteur. Pour ensuite analyser la masse des molécules chargées, on utilise un spectre TOF (Time of flight), qui mesure le délai temporel entre l'éclair de lumière UV provenant du laser et l'arrivée au détecteur. Le spectre de masse est obtenu en convertissant le spectre TOF en  $m/z$  en utilisant des équivalences préalablement déterminées lors de la calibration de l'appareil. Lorsque le spectre obtenu n'est pas suffisamment bien résolu, ou pour augmenter l'intensité du signal, on utilise des systèmes de détection en mode réfléchi et en mode d'extraction retardée. La première méthode consiste à insérer un miroir électrostatique permettant de séparer des ions de masse identique selon leur taille et leur charge, qui modifient l'énergie cinétique de la molécule, et on augmente ainsi la résolution pour des masses très semblables. Le mode d'extraction retardée se distingue par l'endroit où est réalisé son action. Lors de l'accélération des particules par le champ électrique, on applique un voltage

supplémentaire dans la plaque pour moins d'une microseconde. En ajustant les équivalences TOF à  $m/z$ , on obtient un signal exact mieux résolu.



**Figure 2.6 : Schéma décrivant les différentes étapes suivies par l'échantillon en spectroscopie de masse.** L'échantillon est vaporisé, ionisé, puis accéléré avant de passer dans un champ magnétique qui forcera la séparation des ions selon leur taille. Tous les ions avec la même charge acquièrent approximativement la même énergie cinétique, déterminée par le voltage appliqué. Donc, le temps que prennent les ions à arriver au détecteur est proportionnel à leur masse moléculaire.

Avant de préparer la matrice contenant l'échantillon, les polypeptides sont purifiés à l'aide d'une nano-colonne contenant 100-300nl de charbon actif de source commerciale (C-5510, Sigma, Etats-Unis) dans une pointe de pipette. On utilise une seringue de 1ml pour faire passer l'échantillon au travers de la nano-colonne en réalisant une pression manuelle. La colonne est préalablement équilibrée avec de l'acide trifluoroacétique 0,1% (TFA) et les polypeptides sont élués directement sur la matrice avec 0,5µl de solution CHCA (Acétonitrile 20µg/µl, TFA 70/30 v/v).

Pour améliorer le rapport signal/bruit, une moyenne de 200-300 spectres a été effectuée, ce qui porte l'erreur absolue à moins de 70ppm. Les fragments de protéine ont été identifiés par une banque de séquences protéiques non-redondantes de NCBI en utilisant le moteur Mascot. Les paramètres utilisés pour la recherche autorisaient l'oubli de 2 sites de protéolyse, la carboxyméthylation complète des cystéines et l'oxydation partielle des méthionines.

## **CHAPITRE 3 :**

### **CARACTÉRISATION DU COMPLEXE FORMÉ DE DnaK ET DE RCMLA**

L'étude du mécanisme de liaison du substrat à DnaK a été axée jusqu'à présent sur la chaperonne plutôt que sur le substrat. Les observations publiées sur le sujet portent principalement sur les changements conformationnels de DnaK lorsqu'un substrat s'y lie (66, 86). De courts peptides d'au plus 11 acides aminés sont alors utilisés afin que DnaK adopte sa forme de haute affinité. Les études qui incluent des données avec un substrat plus grand font usage de la luciférase ou la malate déshydrogénase afin généralement de quantifier l'efficacité de l'enzyme (82, 87). D'autres ont utilisé la RCMLA comme compétiteur à un autre substrat ou pour aider l'échange de nucléotide par la liaison de substrat de cet enzyme allostérique (88, 89). Le ou les sites de liaison de DnaK sur la RCMLA est un sujet qui n'a jamais été étudié d'un point de vue structural. L'avantage peu négligeable d'un tel projet est de vérifier sur le même substrat la théorie du mode d'action de la chaperonne dite de «holdase » et d'identifier des sites de liaison sur le substrat.

#### **3.1 Détermination des conditions de formation de complexe et spécificité**

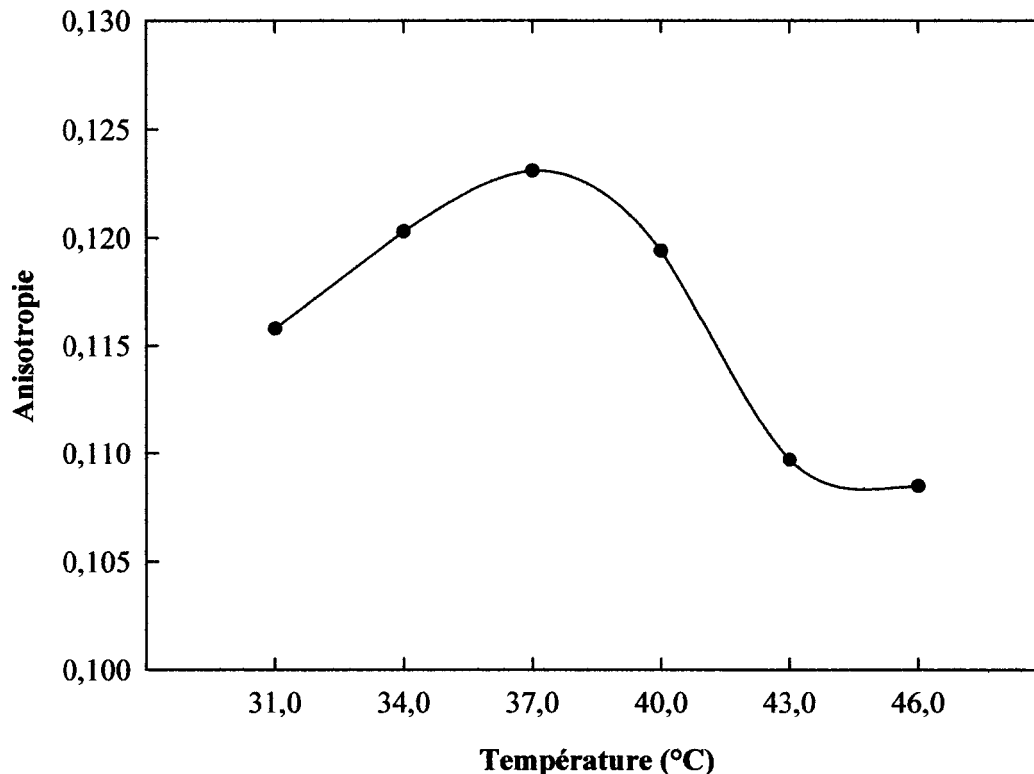
Compte tenu de la faible quantité d'informations concernant le système considéré et puisque les études antérieures n'ont décrit pour la plupart que le caractère compétitif de la RCMLA à un autre substrat de DnaK, de nombreuses expériences préliminaires ont dû être réalisées afin de favoriser la formation d'un complexe stable et en quantité optimisée. La difficulté provient de la grande sensibilité du système à son environnement. Ainsi, à cause de variations minimales de température ou du temps d'incubation, on pourrait être amené à interpréter les résultats de façon erronée. Les expériences préliminaires les plus importantes sont présentées dans cette section. En plus, la question de la spécificité de l'interaction entre les deux protéines est abordée.

### **3.1.1 Effet de la température sur la liaison de DnaK au substrat**

L'anisotropie de fluorescence peut être utilisée pour évaluer la liberté de mouvement d'un fluorophore. En liant de façon covalente un fluorophore sur un polypeptide, les variations de mobilité du polypeptide peuvent être mises en évidence. La RCMLA a été marqué à l'extrémité N-terminale par la fluorescéine (FITC) et jointe à DnaK (figure 2.3). Si la chaperonne piège le substrat, les mouvements de la RCMLA-FITC seront sensiblement limités et l'anisotropie augmentera. L'anisotropie de fluorescence comme moyen de mesurer la quantité de complexe formé a été utilisée afin de déterminer la température optimale de liaison du substrat à la chaperonne (figure 3.1). La température la plus appropriée pour la liaison de RCMLA à DnaK est de 37°C. À moins d'indication contraire, cette température sera utilisée pour toutes les expériences réalisées sur ces deux protéines.

### **3.1.2 Effet de la présence de potassium dans le tampon**

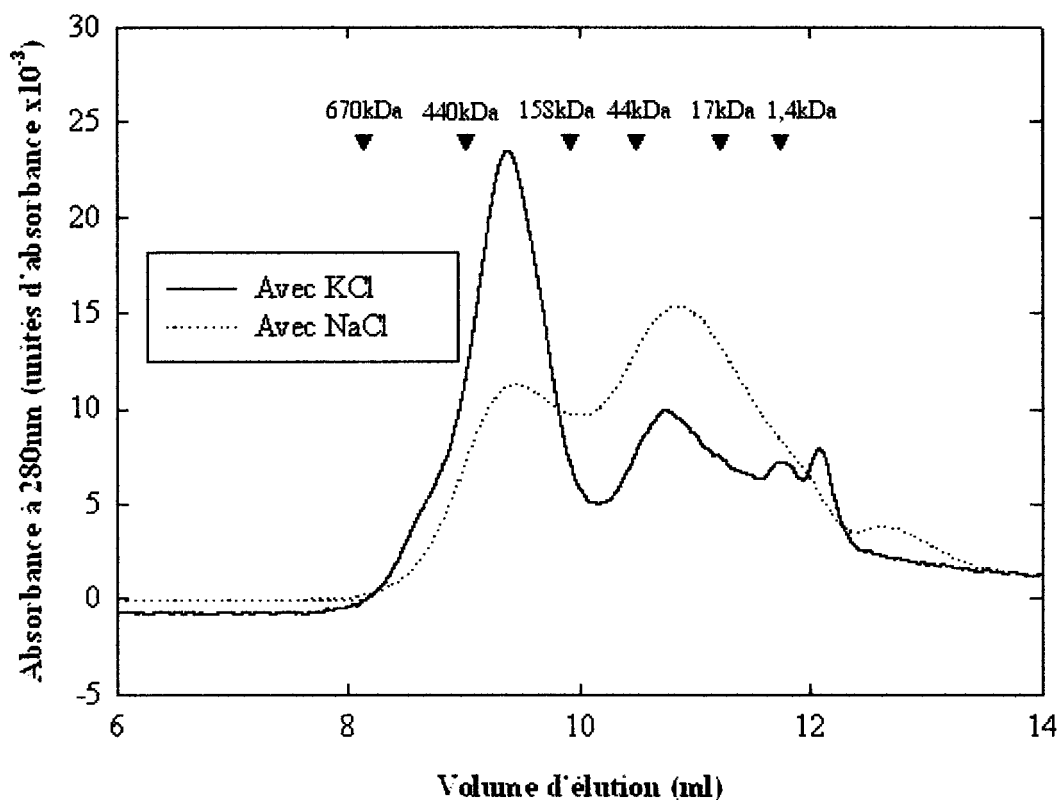
L'absence de potassium dans le tampon est souhaitable pour les études biochimiques qui requièrent l'utilisation fréquente de gels de polyacrylamide (SDS-PAGE) puisque le potassium fait précipiter le SDS. Dans le cas présent, des études montrent que cet ion joue un rôle sur l'efficacité enzymatique de DnaK (90). Ainsi, il a été nécessaire d'examiner la capacité de DnaK à se lier à RCMLA en présence de potassium et lorsque substitué par un autre ion. Des chromatographies sur colonne d'exclusion de taille ont été effectuées avec un tampon 60mM Tris, 150mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub> et avec le même tampon dans lequel le KCl était substitué par le NaCl (figure 3.2). Les chromatographies d'exclusion de taille séparent aisément le complexe de DnaK avec RCMLA (dont la taille est supérieure à 73kDa) de la RCMLA libre (14kDa). En comparant les chromatogrammes obtenus, on observe une plus grande quantité de complexe formé lorsque le tampon contenant du potassium est utilisé. L'absorbance de la bande associée à la RCMLA libre varie inversement à celle du complexe. Par conséquent, on prendra soin d'utiliser des tampons contenant du potassium lors des expériences subséquentes.



**Figure 3.1 : Anisotropie de fluorescence mesurée à différentes températures.** Les échantillons de FITC-RCMLA 50nM sont incubés en présence de DnaK 1,2 $\mu$ M et d'ADP 1mM à la température indiquée durant 30 minutes sous agitation faible avant l'enregistrement. La formation de complexe est maximale à 37°C.

### 3.1.3 Temps d'incubation nécessaire à l'équilibre enzymatique

DnaK étant un enzyme à régulation allostérique, la liaison des nucléotides et celle du substrat sont étroitement liés. La liaison de l'ADP sur le domaine de liaison des nucléotides de la chaperonne modifie la conformation de l'enzyme en une forme à haute affinité pour le substrat (voir figure 1.6). L'association du substrat en présence d'ADP est beaucoup plus lente que la dissociation en présence d'ATP, et ceci constitue l'étape limitante de la formation du complexe entre DnaK et RCMLA. La figure 3.3 montre l'action des nucléotides telle que mesurée par l'anisotropie de fluorescence. On voit clairement que la liaison de DnaK à RCMLA requiert un temps d'incubation de plusieurs centaines de secondes en présence d'ADP pour être complète. Les



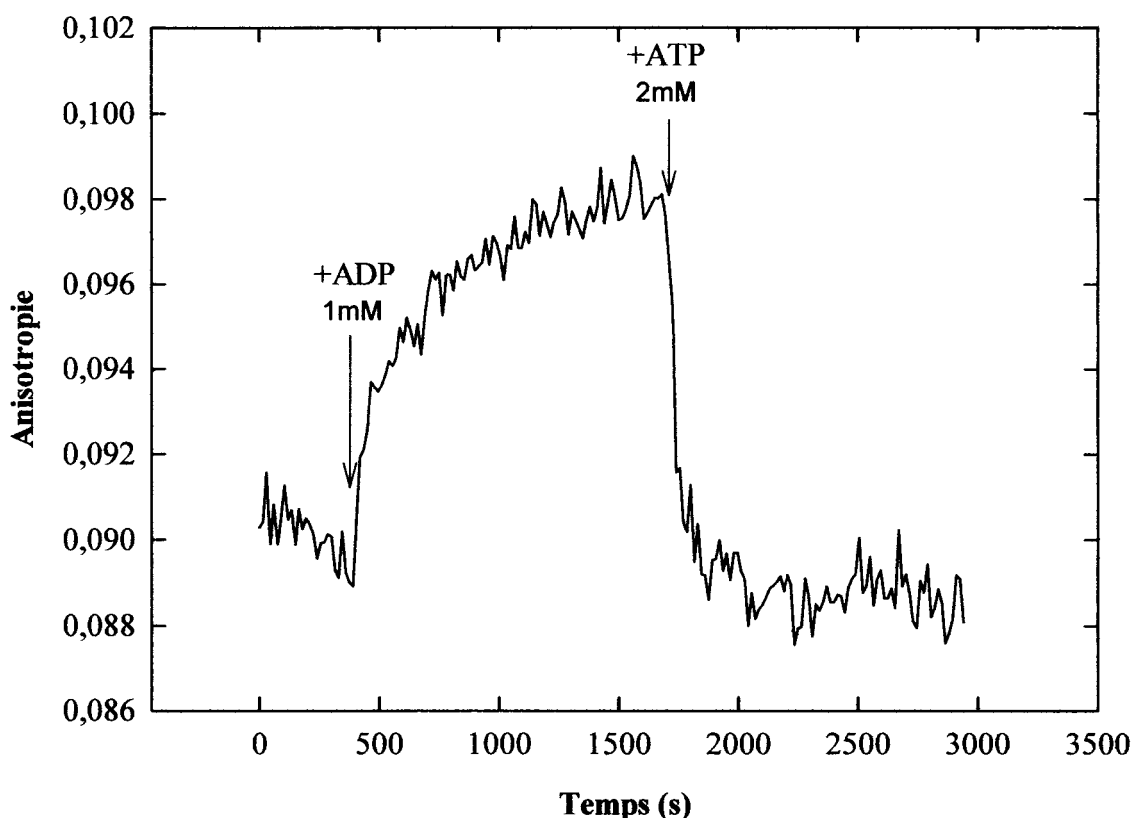
**Figure 3.2 : Chromatogrammes résultants de l'injection de RCMLA avec DnaK dans un tampon contenant du KCl ou du NaCl.** Le tampon d'élution est composé de 60mM Tris, 150mM KCl ou NaCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4mM ADP, 1mM DTT et le pH est ajusté à 7,0. Les protéines sont laissées à incuber dans le tampon d'élution durant une demi-heure avant l'injection.

échantillons seront donc incubés un minimum de 30 minutes avant chaque expérience, ce qui assurera l'état d'équilibre du système.

### 3.1.4 Spécificité de l'interaction entre RCMLA et DnaK

L'expérience de la figure 3.3 apporte plus d'informations que ne le suggère la section précédente : elle renseigne également sur la spécificité de la liaison de la RCMLA à DnaK. L'interaction entre la RCMLA et DnaK, pour rendre compte correctement de la





**Figure 3.3 : Modulation de l'anisotropie de fluorescence par l'action de nucléotides.**

L'échantillon contient 50nM de RCMLA et 1,5 $\mu$ M de DnaK dans une cuvette à fluorescence et des mesures d'anisotropie sont prises à toutes les 15 secondes. Les nucléotides, en solution aqueuse maintenue à 37°C, sont injectés dans la cuvette aux temps indiqués par les flèches. L'anisotropie augmente lors de l'ajout d'ADP et sature en 1300 secondes ( $\approx$ 22 minutes). À l'opposé, l'ATP affecte le mélange par une rapide baisse d'anisotropie qui reflète un retour du système à l'état initial qui est complet en moins de 2 minutes.

liaison entre la chaperonne et son substrat, ne doit pas être quelconque. Si elle simule bien le rôle de substrat, la RCMLA se positionnera dans la pince du domaine de liaison au substrat de DnaK. Sa liaison au domaine SBD de la chaperonne sera alors dépendante du nucléotide uni à l'autre domaine. C'est bien ce qui est visible à la figure 3.3; l'ADP stimule la liaison de la RCMLA marquée alors que l'ATP catalyse son retrait. La liaison de la RCMLA est donc dirigée par l'ouverture et la fermeture de la pince du SBD, ce qui conclut qu'elle se place effectivement à la position du substrat.

### **3.2 Stabilité et dynamique de dissociation du complexe**

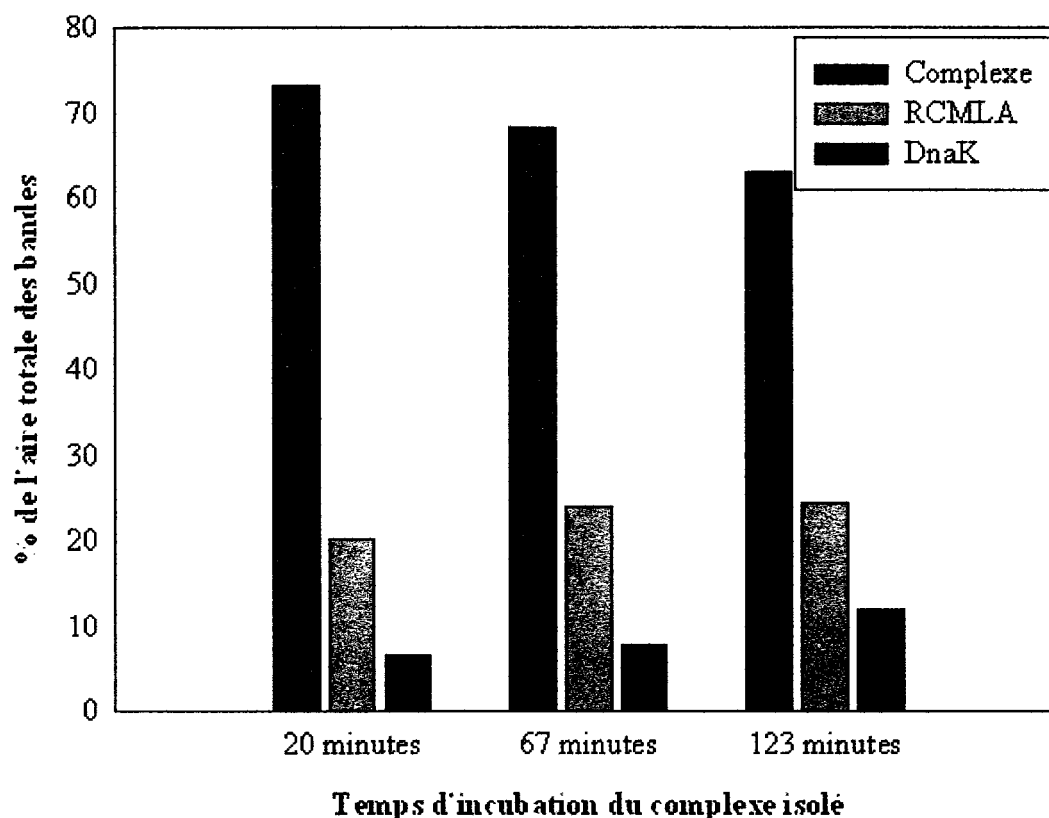
Étudier la dissociation du système DnaK-RCMLA présente une double utilité. Une certaine stabilité temporelle est essentielle à la réalisation de la majorité des expériences mais un complexe qui se dissocie trop peu fréquemment irait à l'encontre d'un aspect important de la théorie de «holdase» dont on souhaite prouver l'existence. En effet, si la liaison de DnaK à son substrat était très stable, ce dernier pourrait difficilement acquérir une forme native dans un temps convenable ou être transféré facilement à une autre chaperonne.

#### **3.2.1 Stabilité du complexe en temps réel**

Pour certaines expériences telles celles qui seront présentées à la quatrième section de ce chapitre, il était important d'avoir un complexe stable pour des périodes de temps variant de une à deux heures. Il fût donc nécessaire de démontrer la stabilité temporelle du système et d'ainsi s'assurer que ces expériences étaient réalisables.

Des échantillons contenant 142 $\mu$ M de RCMLA et 33 $\mu$ M de DnaK ont été incubés à 37°C durant 30 minutes dans un tampon Tris 60mM, KCl 150mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, ADP 0,4mM, DTT 1mM. Par la suite, l'échantillon était injecté sur une colonne d'exclusion de taille et les fractions correspondantes au complexe étaient recueillies (en référence à la figure 3.2 pour le chromatogramme avec KCl, il correspond sur le chromatogramme à la section de 8-10ml de volume d'élution). Le complexe isolé était alors concentré sur des filtres Microcon (Millipores) de rétention moléculaire de 10kDa jusqu'à l'obtention d'un volume d'environ 150 $\mu$ l. Le complexe isolé et concentré était ensuite réinjecté sur la même colonne, lavée et rééquilibrée durant la concentration. Les chromatogrammes obtenus à différents temps d'incubation entre les injections ne peuvent pas être comparés entre eux selon leur absorbance puisque la quantité de solution obtenue de la concentration diffère légèrement.

C'est en comparant l'aire des bandes à l'aire totale qu'on obtient des pourcentages de chacune des bandes qu'il est possible d'analyser. La figure 3.4 montre



**Figure 3.4 : Comparaison des quantités relatives de DnaK et RCMLA liés et libres après isolation du complexe.** L'hétéromère est séparé par chromatographie d'exclusion de taille, concentré et réinjecté sur la colonne différents temps après la première séparation. Le chromatogramme résultant est indicateur de la stabilité du complexe. La dissociation des protéines atteint un équilibre qui varie peu après 20 minutes.

le pourcentage de l'aire totale du complexe, de RCMLA libre et de DnaK libre pour 3 périodes de temps entre les injections distinctes. On y voit que la quantité de complexe diminue légèrement lorsque le temps d'isolation du complexe augmente pour favoriser la présence des protéines libres. Par contre, cette dissociation est négligeable par rapport au temps nécessaire pour effectuer les expériences désirées et la liaison sera considérée comme stable sur une période de deux heures.

La présence d'un complexe formé de RCMLA et de DnaK est donc démontrée et les conditions particulières du milieu favorisant l'interaction ont été établies. L'opération nécessite un tampon avec potassium, une incubation préalable d'un

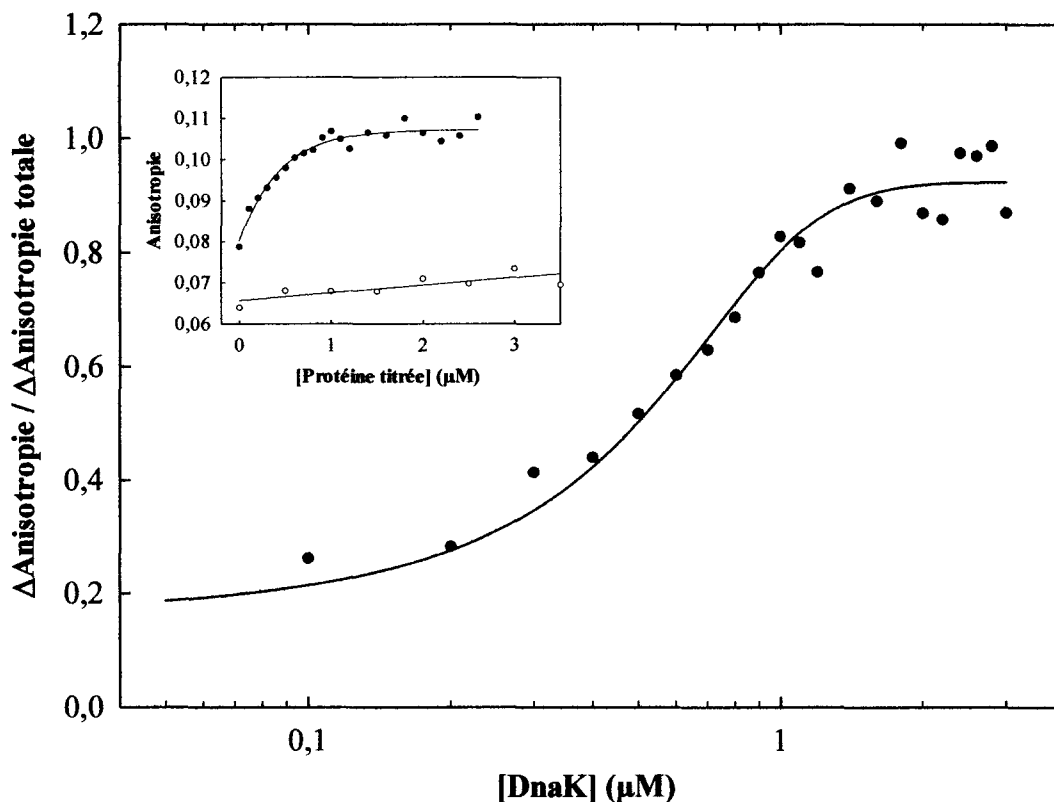
minimum de 22 minutes avec l'ADP et est favorisé par une température de 37°C. Sous ces conditions le complexe est stable sur une période s'étendant jusqu'à 2 heures.

### **3.2.2 Détermination de la constante de dissociation par anisotropie de fluorescence**

L'anisotropie de fluorescence est une méthode dont les résultats ont une marge d'erreur assez élevée. La variabilité est immuable à la faible quantité de fluorophore qu'il faut utiliser. Les résultats que nous obtiendrons concernant le  $K_d$  possèdent une marge d'erreur importante et ne peuvent pas servir à elles seules à prouver une hypothèse, à moins de répéter un grand nombre de fois l'expérience. Le nombre de sites de liaisons peut aussi être estimé de cette façon, mais des résultats plus quantitatifs seront obtenus autrement. Néanmoins, les graphiques obtenus fournissent une base solide pour l'exploration plus détaillée du système par d'autres techniques plus précises, telle le titrage calorimétrique isotherme, que nous utiliserons par la suite. À l'aide de la RCMLA marquée avec la fluorescéine, un titrage est obtenu en variant la concentration de DnaK (figure 3.5), effectué sous les conditions normales de formation du complexe (37°C, 30 minutes d'incubation en présence de 1mM d'ADP).

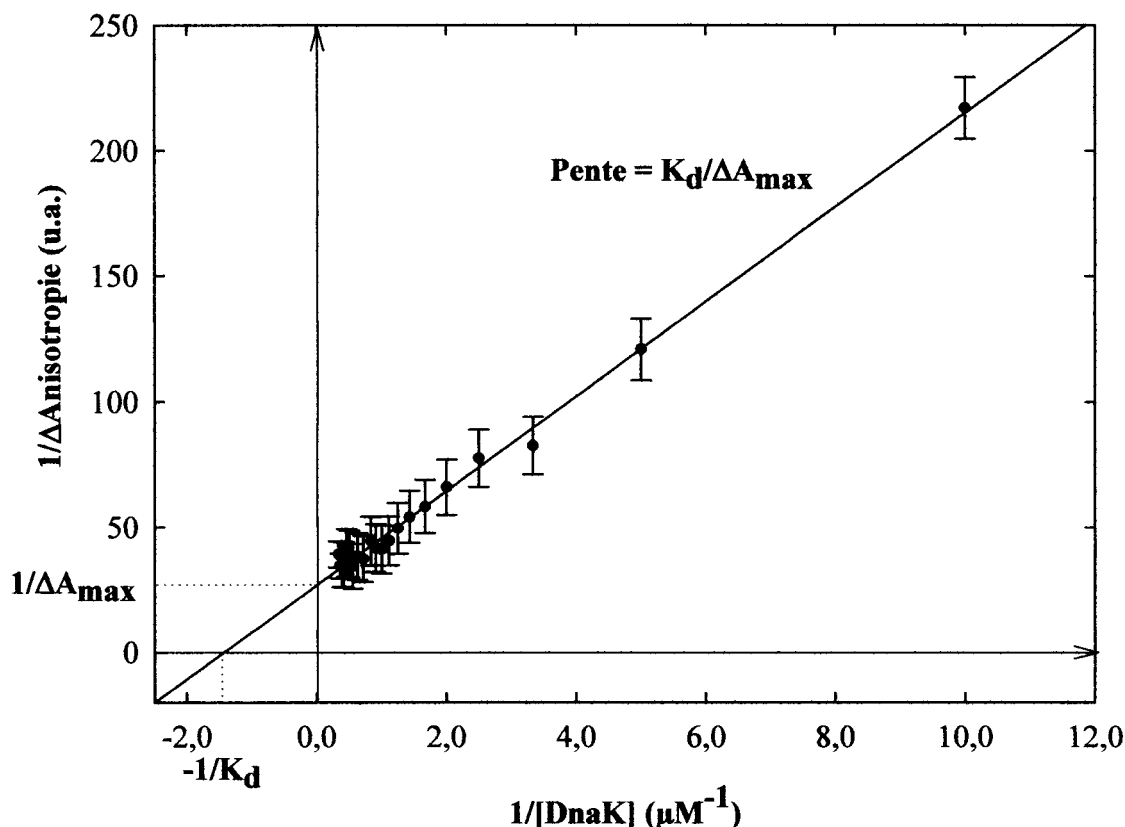
Les données originales avant le traitement mathématique subséquent sont présentées en encart dans ce graphique, de même qu'un contrôle de variation d'anisotropie lors de l'ajout d'une protéine quelconque (le lysozyme, dans le cas présent). Une courbe de type sigmoïdal joint les points du graphique de la figure 3.5.

Un graphique de Lineweaver-Burk en double réciproque est construit pour identifier le  $K_d$  de la liaison de DnaK à RCMLA (figure 3.6). La constante de dissociation mesurée de cette façon est de 0,75 $\mu$ M, soit 15 fois la concentration de RCMLA totale de l'échantillon. La quantité de complexe formé est donc fortement augmentée par une concentration plus élevée de DnaK et elle diminue sensiblement à de faibles quantités de DnaK.



**Figure 3.5 : Titrage de FITC-RCMLA par DnaK, suivi par anisotropie de fluorescence.** 50nM de RCMLA marquée permettent de suivre la liaison du substrat à DnaK en variant la concentration de la chaperonne. Les résultats sont montrés par les ronds pleins alors que les ronds vides présentent un contrôle de la spécificité de l'anisotropie réalisée en titrant avec le lysozyme au lieu de DnaK. La présentation de la liaison du substrat normalisée à 1, en fonction de la concentration de protéine mise en échelle logarithmique met en évidence le point d'inflexion où est située la constante de dissociation. L'encart présente le résultat avant traitement des données obtenu sur l'appareil, soit l'anisotropie de fluorescence en fonction de la concentration de DnaK.

La constante de dissociation n'évalue pas que la proportion de constituants du complexe à l'état libre et réunis. On peut la comparer avec d'autres valeurs de  $K_d$  pour des systèmes semblables ou pour des modèles ayant au moins un constituant du mélange semblable. Dans le cas présent, l'expérience nous apprend qu'on devra prendre soin dans les prochaines expériences de ne pas utiliser une concentration de DnaK inférieure à 0,75 $\mu$ M, puisque les résultats ne seraient pas significatifs. De plus, comme les



**Figure 3.6 : Graphique en doubles réciproques (Lineweaver-Burk) du titrage de DnaK sur FITC-RCMLA.** L'ordonnée à l'origine d'un tel graphique donne la valeur de  $1/\Delta A_{\max} = 26,95 \text{ (u.a.)}^{-1}$  et son abscisse à l'origine est l'inverse négatif de la constante de dissociation, d'une valeur sur le graphique de  $-1,433 \mu\text{M}^{-1}$ , indiquant un  $K_d$  de  $(0,75 \pm 0,24) \mu\text{M}$ . L'équation définit la pente du graphique avec un  $R^2$  de 0,9945. Les barres d'erreurs tirent leur origine de trois répétitions indépendantes de la même expérience.

constantes de dissociation de d'autres chaperonnes en complexe avec la RCMLA ont été trouvées, la comparaison de ces valeurs sera réalisée dans le chapitre suivant.

### 3.3 Optimisation de la formation du complexe de DnaK et de RCMLA

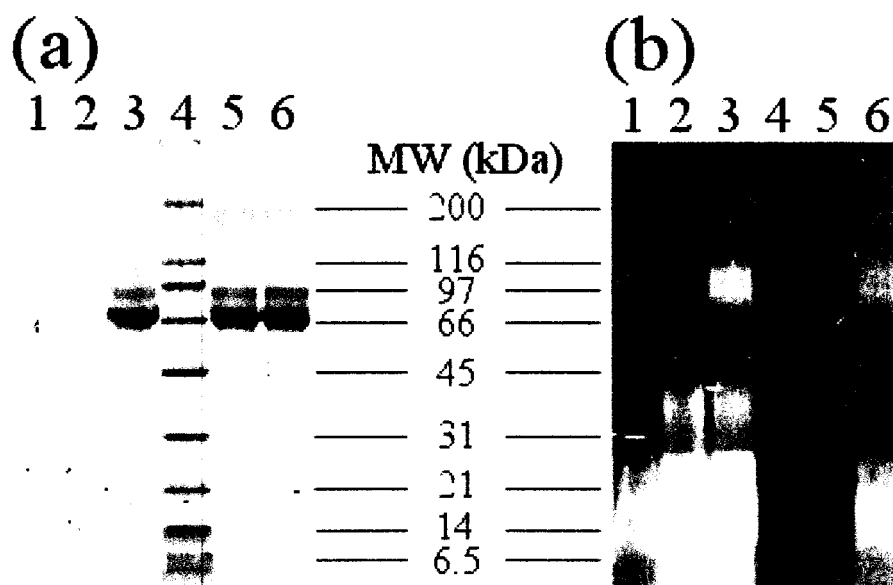
La quantité et, parfois, la nature d'un complexe enzyme-substrat est dépendant des concentrations des molécules qui le constituent. Règle générale, on s'assure de l'absence de l'un ou l'autre des composants du complexe à l'état libre en mettant l'autre

en excès et on peut également favoriser la formation de complexes différents selon les ratios utilisés. Cette section dédiée aux ratios de DnaK avec RCMLA permettra donc à la fois de visualiser le complexe et de contrôler la quantité de chacune des protéines qu'il est le plus judicieux d'utiliser pour les expériences subséquentes.

### **3.3.1 Utilisation d'agents pontants (crosslinkers) pour la révélation du complexe par SDS-PAGE**

Les protéines qui migrent en SDS-PAGE ne gardent pas leur conformation native. En plus d'incorporer une charge négative aux protéines, le SDS les dénature et dissocie les complexes et agrégats protéiques. La visualisation de complexes sur un gel en SDS- PAGE requiert donc l'utilisation d'agents pontants qui, incorporés au mélange protéique, préviendront la dissociation du complexe. Comme leur nom l'indique, ces molécules forment un lien covalent entre des protéines se trouvant à proximité l'une de l'autre. Dans le cas présent, on a utilisé un agent d'une longueur de 11,4Å, le Bis-[Sulfosuccinimidyl]-suberate (BS<sup>3</sup>) pour lequel le sel Tris est un inhibiteur efficace. Le BS<sup>3</sup> établit un pont entre deux lysines situées à de courtes distances (11,4Å ou moins) l'une de l'autre. La RCMLA présente une composition forte en lysines, le BS<sup>3</sup> avait donc plus de chances d'être efficace. On ajoutera le Tris peu de temps (40 minutes) après l'incorporation de l'agent pontant pour éviter la formation de larges agrégats protéiques. Nous l'avons fait agir sur le complexe DnaK-RCMLA préalablement formé ainsi que sur chacune des protéines séparément, à des fins de contrôle.

La figure 3.7 montre un gel en gradient de 5-20% de polyacrylamide sur lequel ont été déposées les protéines liées par BS<sup>3</sup>. La modulation des ratios respectifs des protéines est assurée par la quantité de RCMLA alors que la concentration de DnaK demeure constante. Vu l'importante différence de taille entre la chaperonne et son substrat (DnaK a une masse moléculaire près de 5 fois plus élevée que RCMLA), et puisque les expériences requièrent une concentration plus grande de DnaK que de RCMLA pour vérifier l'hypothèse de «holdase », des quantités infimes du substrat ont dûes être utilisées afin de ne pas saturer le gel. La visualisation de ces petites quantités



**Figure 3.7 : Gel d'électrophorèse sur gradient de polyacrylamide montrant le complexe formé par FITC-RCMLA et DnaK en présence d'agents pontants.** La partie (a) montre le gel original tel que révélé par le bleu de Coomassie alors que la partie (b) est une photo du même gel inséré dans un transilluminateur. Tous les échantillons contiennent un total de 400 $\mu$ M de BS<sup>3</sup> qu'on a laissé agir en présence des protéines durant 40 minutes à 37°C. Les puits 1 et 2 contiennent respectivement 1,02 $\mu$ g et 3,05 $\mu$ g de FITC-RCMLA. Le puits 5 renferme 15 $\mu$ g de DnaK, le puits 4 présente l'échelle de masses moléculaires dont les valeurs sont indiquées sur la figure au centre et les puits 3 et 6 contiennent le complexe RCMLA-DnaK. Ces deux puits contiennent 15 $\mu$ g de la chaperonne et la variation de la quantité de RCMLA détermine le ratio molaire entre les protéines soit 1 :1 au puits 3 (3,05 $\mu$ g RCMLA) et 1 :3 au puits 6 (1,02 $\mu$ g RCMLA).

de substrat a été rendue possible par l'utilisation de la RCMLA marquée (FITC-RCMLA), et révélation des sondes au moyen d'un transilluminateur.

La photo prise dans le transilluminateur est plus riche en information que le gel original coloré au bleu de Coomassie. La quantité de complexe formé est faible et sa présence ne peut être confirmée que par la fluorescence. L'expérience montre un complexe composé de DnaK et de FITC-RCMLA de masse similaire pour les deux ratios testés, soit 1 : 1 et 1 : 3 de RCMLA : DnaK. Par sa taille, il est probable que ce complexe soit formé d'une molécule de chaperonne et de une ou plusieurs molécules de



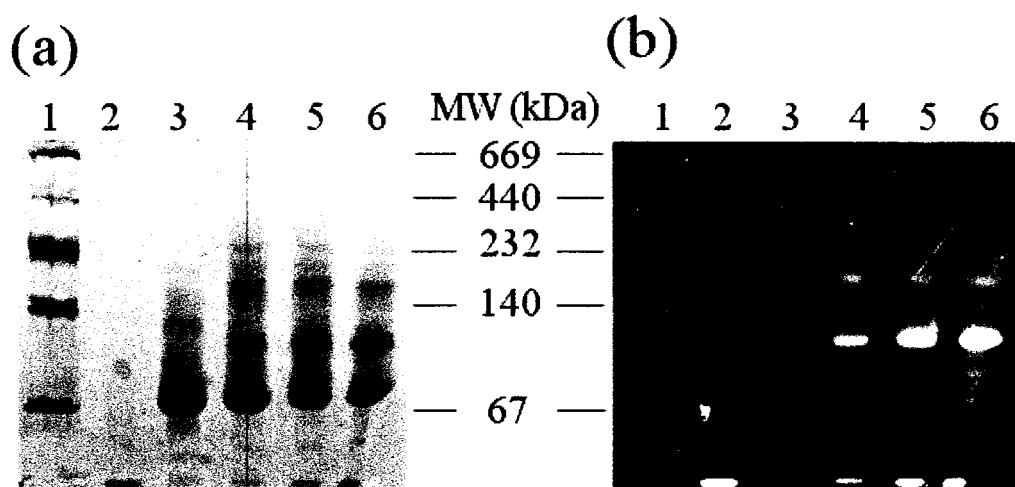
RCMLA, dont la quantité est difficile à évaluer vu le faible poids moléculaire de ce substrat.

### **3.3.2 Les gels natifs pour l'optimisation du ratio de DnaK et de RCMLA.**

Les gels natifs sont généralement plus ardues d'utilisation que les gels contenant du SDS, d'utilisation plus courante, et ils donnent des résultats peu prévisibles. Les protéines déposées sur le gel n'étant pas chargées négativement par le SDS, la migration sur le gel se fait selon les charges intrinsèques, les protéines pouvant donc également migrer vers la cathode dans certains cas. Leur utilisation s'est cependant révélée utile pour caractériser le complexe de DnaK et de RCMLA puisque les protéines et le complexe ont été séparés efficacement et la résolution s'est avérée supérieure à celle obtenue en présence d'agents pontants et de SDS. La figure 3.8 expose différents ratios de protéines formant le complexe RCMLA-DnaK sur un gel natif formé d'un gradient de 8 à 25% d'acrylamide. Chacun des échantillons était incubé un minimum de 30 minutes en présence d'ADP à 37°C avant son chargement sur le gel

Les ratios étudiés présentent tous une quantité plus ou moins grande du complexe d'une taille se situant entre 67 et 140 kDa et qui est apparemment le même que celui observé en SDS-PAGE. La présence d'une bande supplémentaire de taille supérieure à 140 kDa à la fois sur le gel et sur la photographie de fluorescence suppose l'existence d'un second complexe, plus gros et présent en plus petite quantité que le précédent. Vu sa grande taille et l'absence de la bande sur le contrôle de RCMLA seule, ce nouvel élément est vraisemblablement constitué de plusieurs molécules de DnaK et d'au moins une molécule de RCMLA. La question de la taille du complexe observée sur les gels et de leur signification sera élaborée en détails dans le prochain chapitre.

Il est intéressant d'observer que ce complexe est présent dans une plus grande proportion lorsque le ratio RCMLA : DnaK est de 1 : 5, tel que déterminé par la quantité totale de RCMLA dans l'échantillon. Malheureusement, puisque le gel est en gradient



**Figure 3.8 : Gel de polyacrylamide natif présentant différentes concentrations de DnaK à une quantité de RCMLA constante.** Les deux parties présentées sont des représentations du même gel coloré au bleu de Coomassie (a) et révélé par fluorescence dans un transilluminateur à ADN/ARN (b). Le puits 1 est un standard protéique dont les poids moléculaires sont indiqués au centre, le deuxième puits contient comme unique constituant 2,5µg de RCMLA alors que le puits 3 est de DnaK seule (12,3µg). Les puits 4, 5 et 6 présentent les deux protéines en complexe dans des ratios de 1 : 1, 1 : 3 et 1 : 5 de RCMLA : DnaK, respectivement.

de polyacrylamide et qu'il est de type natif, il est impossible de déterminer avec précision la taille de l'amas protéique représenté par cette bande.

### 3.3.3 Caractérisation des complexes par chromatographie d'exclusion

Sur un tamis moléculaire, la RCMLA marquée par le fluorophore FITC a de nouveau permis d'identifier avec certitude les fractions contenant la protéine. Puisque la colonne utilisée séparait facilement la RCMLA de DnaK et du complexe mais ne résolvait pas clairement ces deux derniers, on a pu suivre la liaison du substrat à la chaperonne par l'absorbance à 494nm. Afin de visualiser DnaK, l'absorbance dans l'ultraviolet a également été mesurée. Cependant, comme le tampon contenait 0,4mM d'ADP, substance absorbant fortement à 280nm et rendant le détecteur aveugle à une

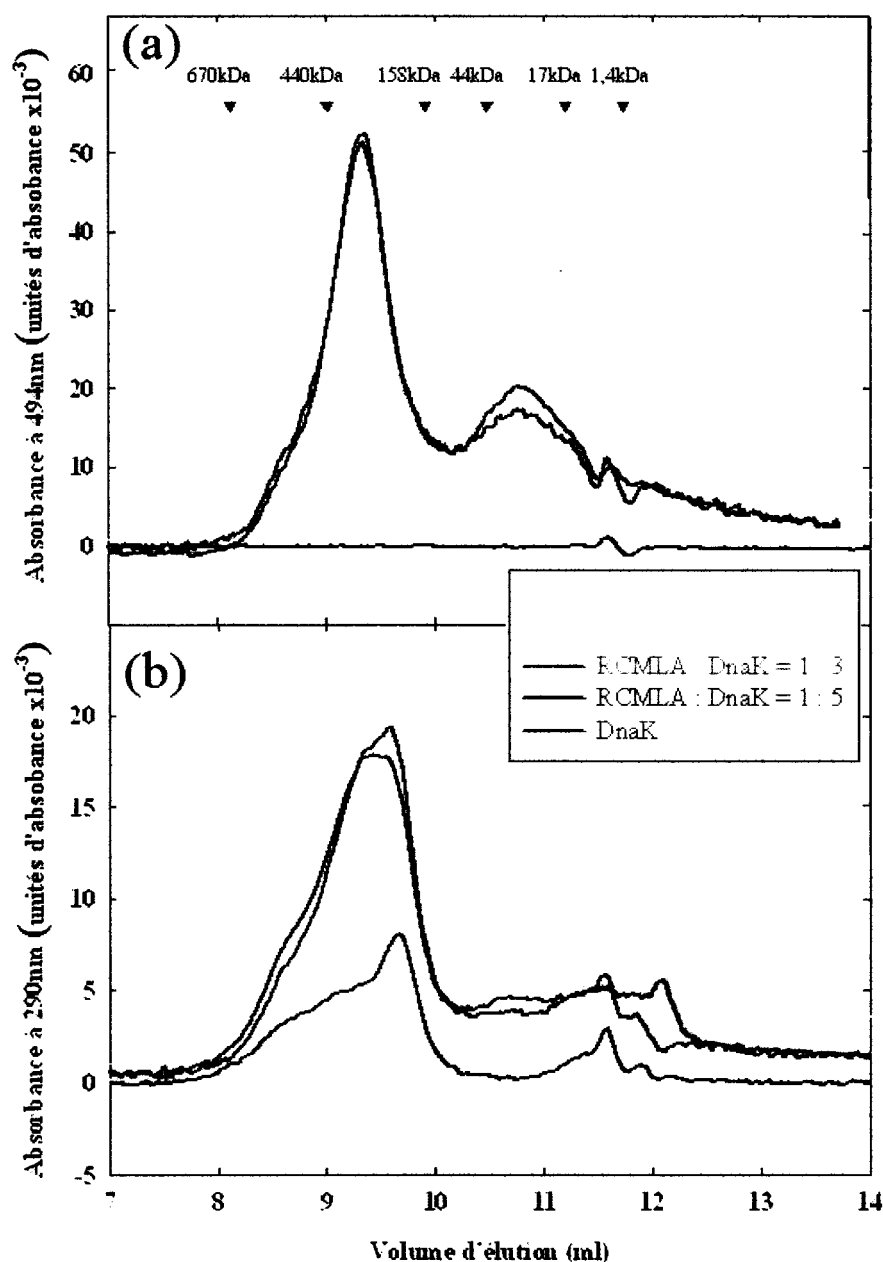
telle concentration, l'appareil a été réglé pour détecter l'absorbance à 290nm pour lequel DnaK absorbe, bien que moins fortement qu'à 280nm.

Les chromatogrammes résultants sont présentés à la figure 3.9. La liaison du substrat à DnaK est favorisée par un ratio protéique plus important en chaperonne tel que vu par la hausse de la bande du complexe (à un volume d'élution de 9,35ml). On remarque, à la partie (b), que la RCMLA libre diminue lors de l'ajout de DnaK jusqu'à atteindre une valeur constante attribuable à une saturation des sites de liaison. Le poids moléculaire du complexe, tel que déterminé par les protéines de calibration (voir la figure 3.7 (a)) est chiffré à 199kDa, approximation qui suggère un ratio protéique différent de 1 pour 1. Il est cependant peu recommandé de se fier à la taille évaluée par les gels et la colonne d'exclusion de taille pour le système de DnaK et de la RCMLA, des interprétations de leur valeur et de leur relevance seront données au chapitre de la discussion.

Ce résultat et ceux qui le précèdent suggèrent tout de même que la création du complexe est favorisée par un excès de DnaK. Les conditions particulières à la création d'un second complexe, plus gros et présent en petite quantité seront évaluées au chapitre suivant.

### **3.4 Calorimétrie, thermodynamique et détermination du nombre de sites de liaison**

Les mesures de la différence d'entropie, d'enthalpie et d'énergie libre de Gibbs pour la liaison entre DnaK et RCMLA permettent d'évaluer l'énergie mise en jeu lors de la liaison du substrat. Dans cette section, la façade dynamique du système protéique et la force de l'interaction sont mises en évidence par la constante de dissociation, qui a été déterminée de deux façons différentes dans le cadre du projet. Puis, la question du nombre de sites de liaison entre la chaperonne et le substrat est examinée. Elle est d'une importance capitale pour la présente étude car elle vérifie l'hypothèse du mode d'action de l'enzyme.

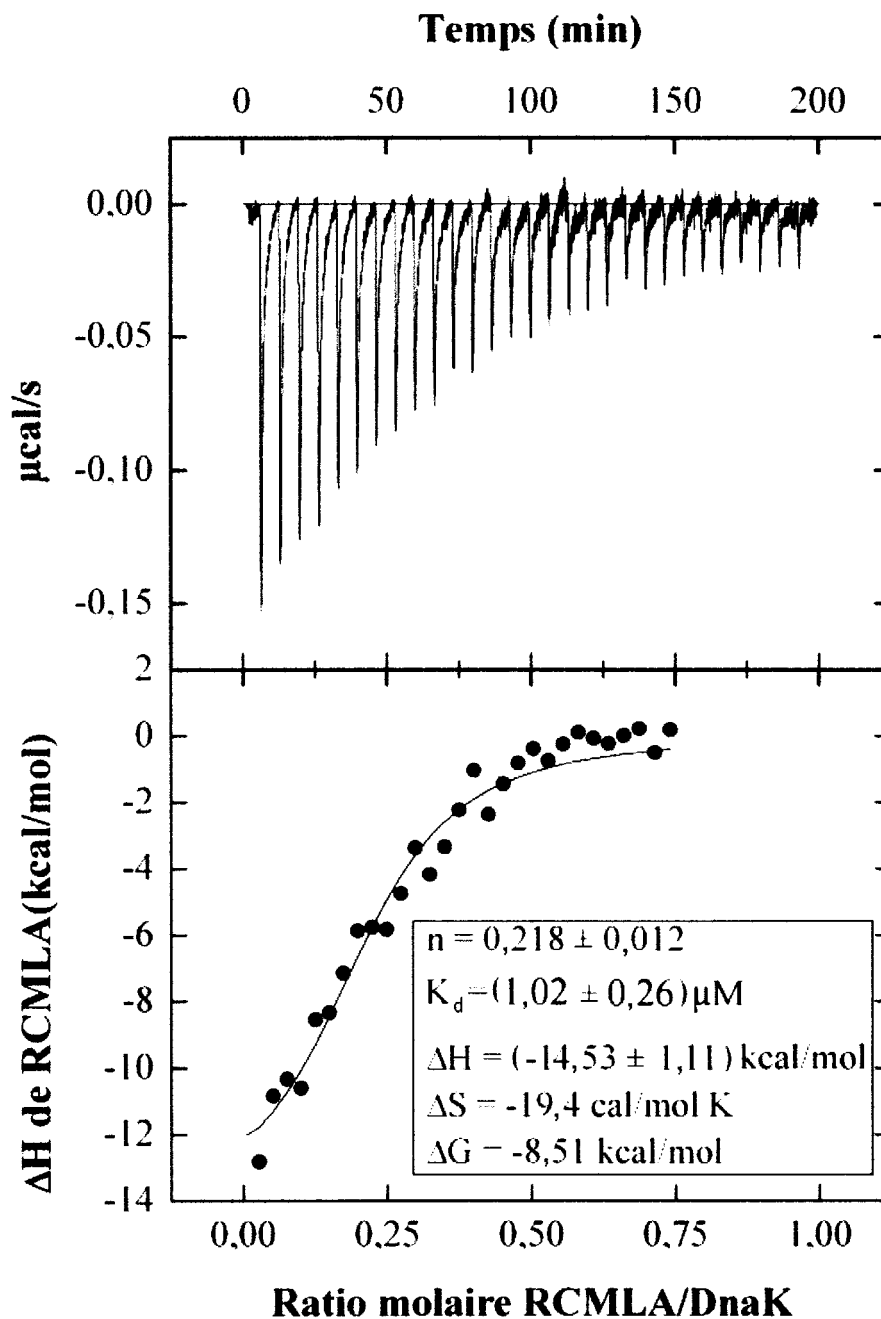


**Figure 3.9 :** Chromatogrammes du complexe RCMLA-DnaK formé à différents ratios et révélés par l'absorbance à 290nm et à 494nm. Les résultats sont normalisés par l'aire totale sous la courbe à 494nm. En (a) comme en (b), deux bandes principales sont visibles : celle située à 10,75ml représente la FITC-RCMLA alors que celle située à 9,35ml est attribuable au complexe. Sur la figure (b), un épaulement se forme au complexe dans les échantillons pour lesquels la quantité de DnaK à l'état libre est plus élevée. Cet épaulement est vraisemblablement dû à la DnaK libre, puisqu'il coïncide avec DnaK lorsque cette dernière est injectée seule sur la colonne.

### 3.4.1 Thermodynamique de liaison de DnaK à RCMLA en ITC à 37°C

Lorsqu'un ligand se fixe sur un récepteur, la réaction s'accompagne d'une libération ou d'une absorption de chaleur selon le signe de l'enthalpie standard  $\Delta H_0$  de la fixation. Les microcalorimètres modernes peuvent mesurer des très faibles variations de chaleur. Le principe est très simple : un échantillon et une référence diffèrent uniquement par la présence ou l'absence de l'interaction étudiée. Lorsque la RCMLA est utilisée comme injectant, DnaK est déposée dans la cuvette et, en laissant le système s'équilibrer entre les différentes injections du substrat, on s'assure de la continuité de la réaction observée (figure 3.10). Le paramètre mesuré est la différence d'énergie nécessaire pour maintenir la température de la cuvette à celle qui est programmée. Les résultats sont ensuite comparés à ceux de la référence de la RCMLA injectée dans le tampon dans lequel était DnaK, résultats qui tiennent compte de l'énergie de solubilisation de la protéine-substrat, de ses réactions possibles avec le tampon, des interactions des molécules d'eau entre elles, etc. L'appareil doit être particulièrement sensible et la préparation des échantillons très minutieuse pour mesurer avec précision et exactitude les variations minimales d'énergie.

Le nombre de sites de liaison auquel la figure 3.10 réfère suppose que la molécule injectée (la RCMLA) agit comme le ligand de la protéine dans la cuvette. Pour faire état du nombre de molécules de DnaK sur RCMLA, il faut inverser ce chiffre, ce qui donne  $n = 4,59 \pm 0,24$ . La constante de dissociation obtenue par ITC est de  $(1,02 \pm 0,26) \mu\text{M}$ . Le résultat est semblable à celui obtenu par mesure de l'anisotropie de fluorescence de  $(0,75 \pm 0,24) \mu\text{M}$ . Les différences énergétiques découlant de l'interaction entre les deux protéines sont décrites par les paramètres thermodynamiques d'enthalpie et d'entropie du système lors de la liaison. L'enthalpie est une mesure de la chaleur dégagée par la formation de la liaison ou nécessaire à la réaction. Lorsque négative, comme à la figure 3.10, il y a un dégagement de chaleur quand les protéines sont mises en contact. L'entropie négative reflète au contraire une situation défavorable. Le signe négatif du changement d'entropie associé à la réaction de complexation est compatible avec la diminution



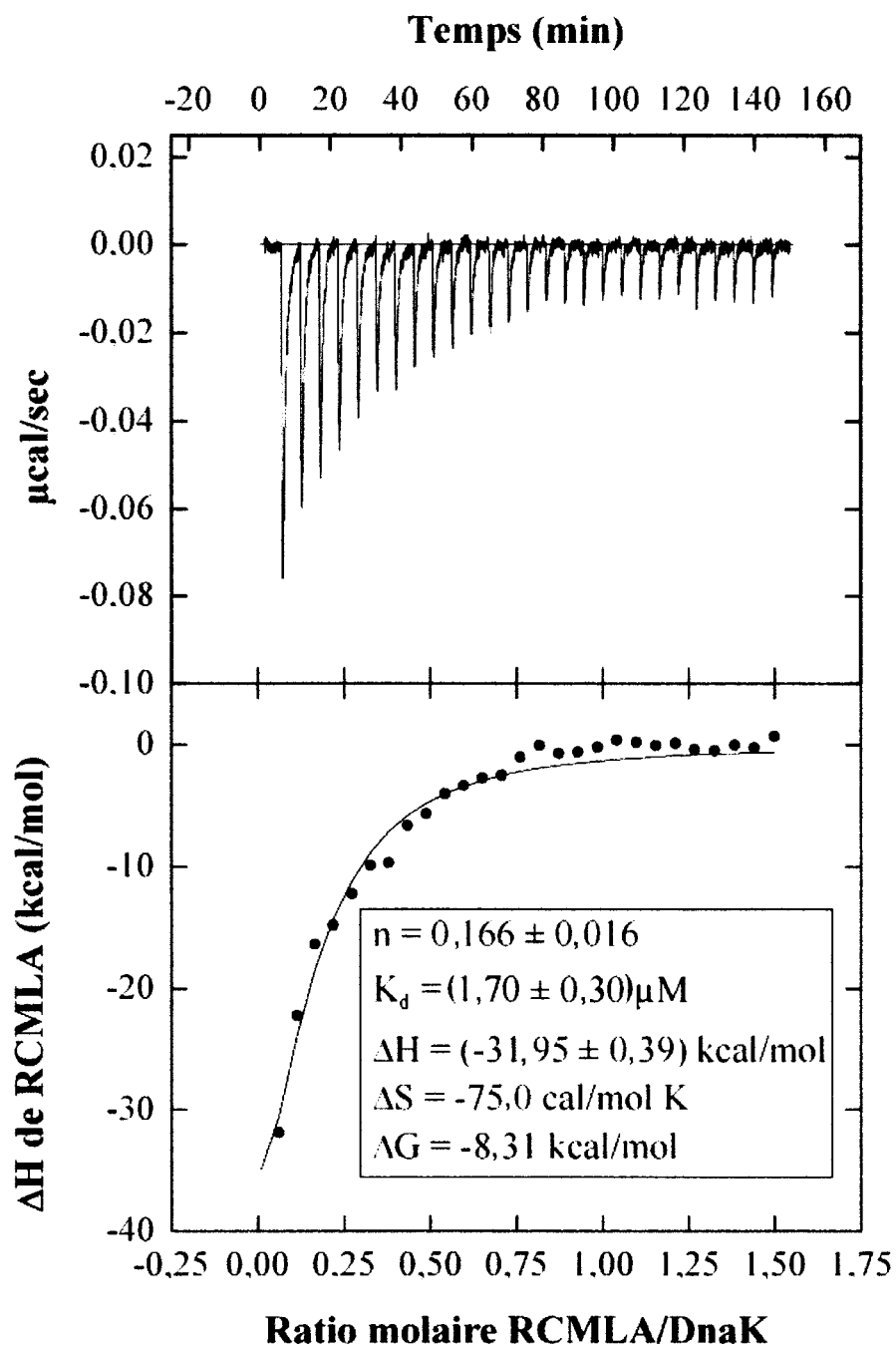
**Figure 3.10 : Titrage calorimétrique isotherme de l'interaction de RCMLA avec DnaK à 37°C.** La RCMLA à une concentration de 130 $\mu\text{M}$  est injectée dans la cuvette (6 $\mu\text{l}$  à tous les 6 minutes) contenant la chaperonne à 22,8 $\mu\text{M}$  et maintenue à une température de 37°C jusqu'à l'obtention d'un signal saturé. La mesure initiale en énergie par unité de temps est ensuite transformée en enthalpie par le calcul de la quantité d'injectant impliqué pour un temps donné.

relative des mouvements de la RCMLA-FITC mise en évidence par les mesures d'anisotropie de fluorescence. Dans un tel cas, où l'entropie et l'enthalpie tirent l'équilibre enzymatique dans des directions opposées, la température détermine la direction qui sera spontanément prise. Il est clair que  $|\Delta H| > |T\Delta S|$ , pour la température physiologique, la formation de complexe est donc spontanée à 37°C. Une autre façon d'observer la spontanéité de la réaction est de calculer l'énergie libre de Gibbs ( $\Delta G$ ), définie comme :  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ . Lorsque négative, le phénomène est produit spontanément, c'est-à-dire sans qu'il ne soit nécessaire de fournir de l'énergie supplémentaire.

### 3.4.2 Thermodynamique de liaison de DnaK à RCMLA en ITC à 42°C

Nous avons répété le titrage dans des conditions de choc thermique (42°C) afin d'observer la réaction de la chaperonne au stress en interaction avec la RCMLA (figure 3.11). Alors que le nombre de sites de liaison, l'énergie libre et même la constante de dissociation ne subissent pas de modifications notables provoqués par la hausse de température, l'entropie et l'enthalpie varient beaucoup. Bien que la formation du complexe soit toujours privilégiée à cette température, on constate que la composante favorable à cette réaction, l'enthalpie, l'est davantage qu'à la température physiologique de 37°C.

L'exploration de la thermodynamique du système composé de RCMLA et DnaK révèle donc la primauté enthalpique dans l'association des protéines. Nous avons montré que la réaction de complexation est gouvernée enthalpiquement et qu'en conséquence des interactions favorables qui s'établissent entre la chaperonne et le substrat, de l'énergie est libérée dans l'environnement. La contribution entropique négative, donc défavorable à la réaction, est compatible avec la diminution des mouvements observée par anisotropie de fluorescence. Elle augmente considérablement à 42°C, mais celle-ci est contrebalancée par une enthalpie dominante. La constante de dissociation a été déterminée de deux façons différentes, les résultats sont semblables et l'interaction est dynamique.



**Figure 3.11 : Titrage calorimétrique isotherme de l'interaction de RCMLA avec DnaK à 42°C.** Sous des conditions de choc thermique, la chaperonne réagit de façon similaire qu'à 37°C mais l'interaction dégage plus de chaleur. Des conditions expérimentales semblables à celles de la figure 3.10 sont employées.



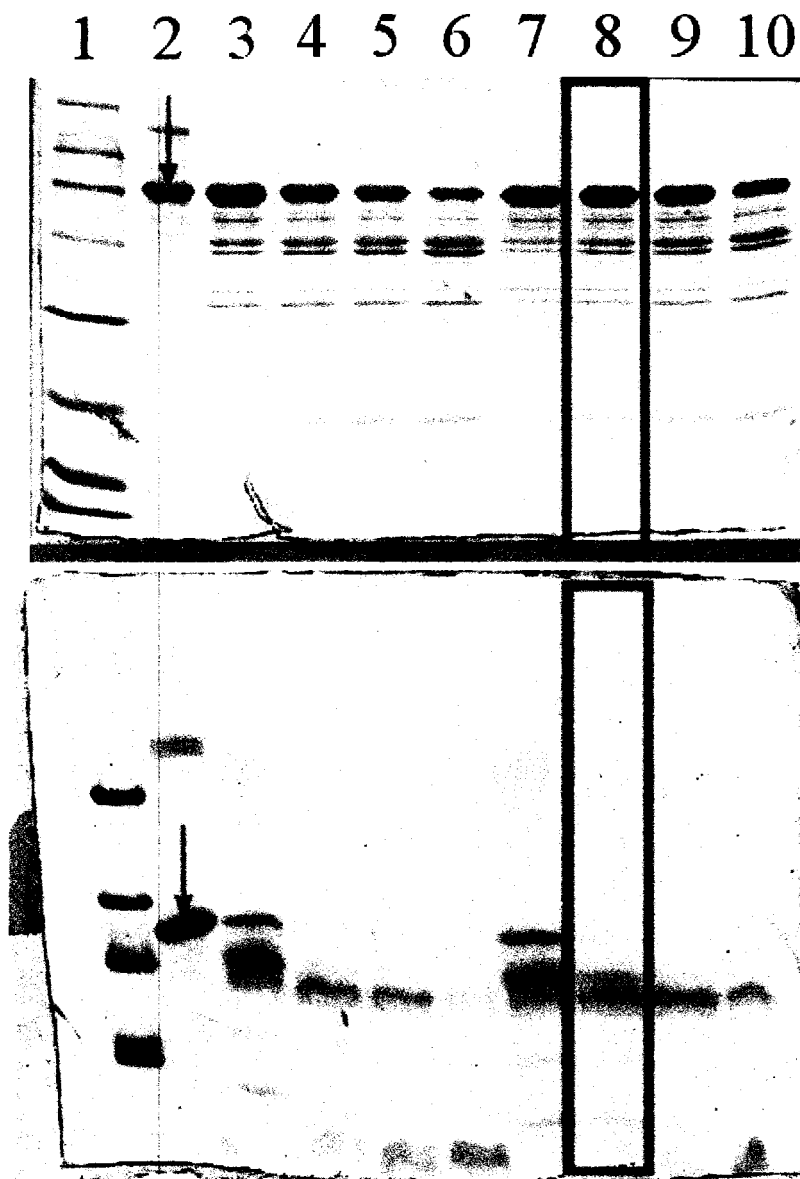
Le nombre de sites de liaison trouvé est compatible avec la théorie du mode d'action de DnaK présentée précédemment, soit de 4 à 5 chaperonnes par RCMLA, à des températures physiologiques, et davantage dans des conditions de stress thermique.

### **3.5 Identification des fragments de RCMLA contenant les sites de liaison à DnaK**

Après avoir démontré avec succès que plusieurs chaperonnes sont présentes dans le complexe RCMLA-DnaK, l'étape suivante est bien entendu d'identifier les différents sites de liaison de DnaK sur la RCMLA. À cette fin, nous avons, après avoir formé le complexe, opéré une digestion partielle du mélange avec une protéase, la trypsine, de façon à couper le substrat aux endroits qui n'étaient pas protégés par la présence de la chaperonne, sans que la digestion n'affecte DnaK elle-même. Profitant d'une préférence statistique de la protéase sur le substrat déplié par rapport à la chaperonne présentant une structure tertiaire bien établie, on espérait obtenir une fragmentation inédite venant d'une impossibilité pour la trypsine d'accomplir son action sur un site recouvert de RCMLA. Hélas, aucun emplacement du substrat ne s'est révélé être, à la fois, un site de coupure de la trypsine et un site de liaison de DnaK. Il fût donc nécessaire d'adopter une autre stratégie de filtrations successives pour identifier les emplacements privilégiés par la chaperonne.

#### **3.5.1 Conditions de digestion partielle du complexe par la trypsine**

Lors d'une digestion partielle, la protéase en concentration infime doit être laissée en contact avec les protéines un temps suffisant pour ne couper que les endroits désirés, soit les sites de plus grande affinité de la protéase ou les emplacements les plus exposés. Des gels SDS-PAGE ont été chargés de solutions de RCMLA et de DnaK à différentes concentrations de trypsine et différents temps d'incubation. La figure 3.12 montre les deux gels de polyacrylamide finaux qui ont déterminé le temps d'action et la concentration de trypsine qui seront utilisés pour l'échantillon du complexe. Ces gels ne contiennent que les ratios 1/750 (puits 3 à 6) et 1/1000 w/w (puits 7 à 10) mais des ratios



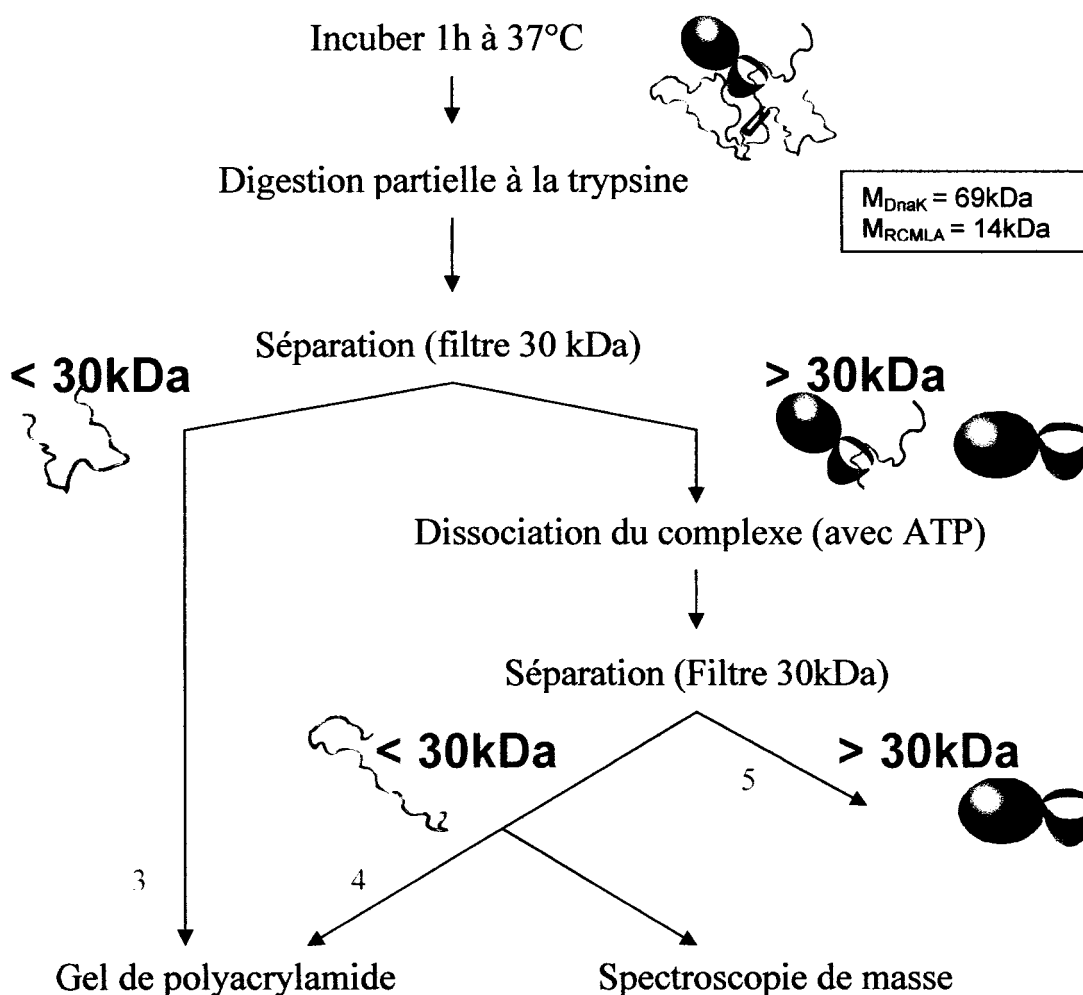
**Figure 3.12 : Gels préliminaires présentant les conditions adéquates de digestion partielle du complexe RCMLA-DnaK.** En haut : gel SDS-PAGE 12,5% acrylamide montrant diverses concentrations de trypsine et différents temps d'incubation de la protéase avec DnaK. En bas : gel tris-tricine 16,5% acrylamide pour l'étude des conditions de digestion de la RCMLA par la trypsine. Le puits 1 contient des marqueurs de poids moléculaire. Les flèches rouges pointent les protéines sans protéases (puits 2) et les rectangles rouges sont les rangées où un ratio de 1/1000 w/w trypsine/protéine totale a digéré le mélange pour une durée de 20 minutes.

de 1/100 à 1/2000 w/w trypsine/protéine à couper ont été examinés. Des temps d'incubation variant de 10, 20, 30 et 60 minutes ont été utilisés (en ordre croissant du numéro du puits sur le gel) et l'essai le plus concluant propose un ratio massique de 1/1000 de trypsine/protéine totale dans le mélange et un temps de digestion de 20 minutes. Dans de telles conditions, la quantité de RCMLA sous forme native est négligeable et DnaK est presque entièrement sous sa forme initiale.

### **3.5.2 Gel de digestion du complexe RCMLA/DnaK par la trypsine**

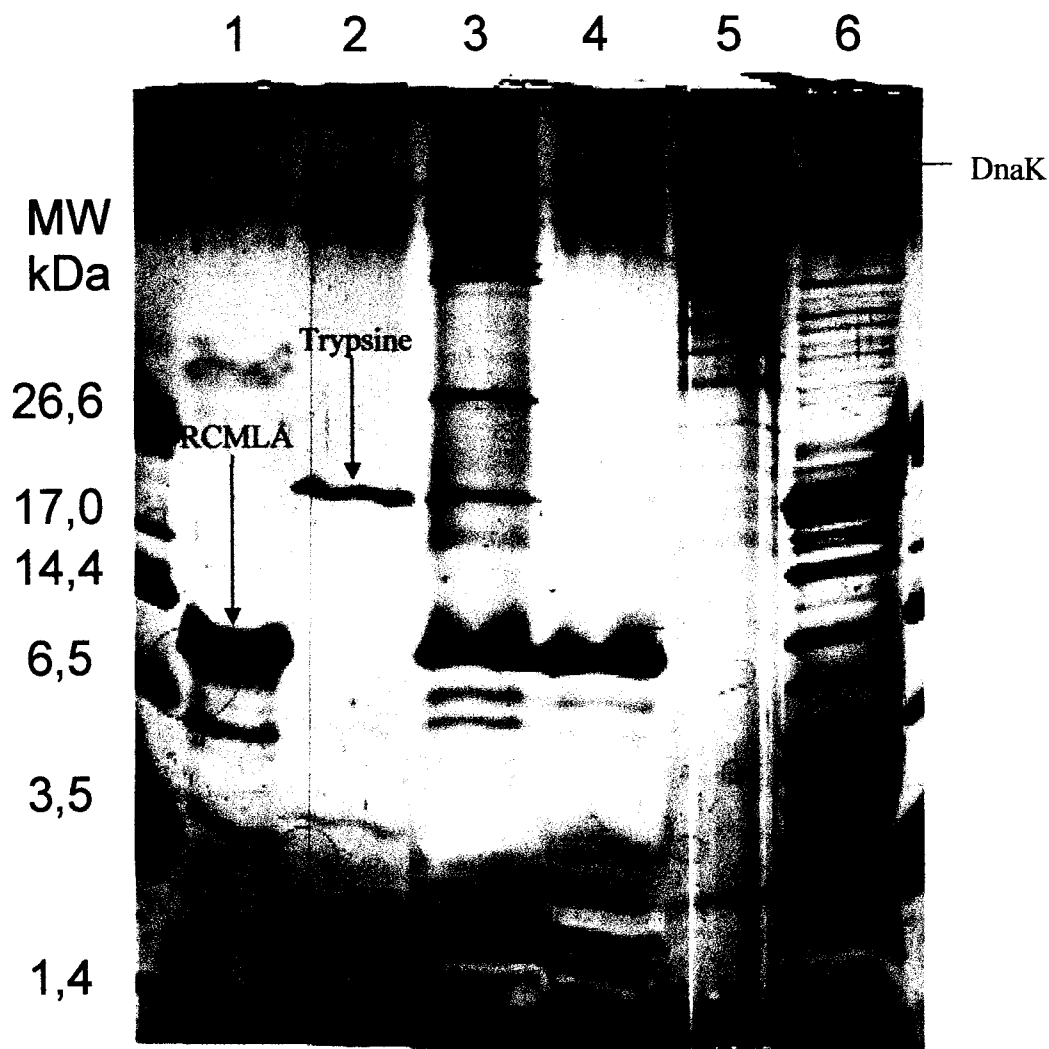
Tel que précisé auparavant, la digestion du complexe n'a pas généré de nouveaux fragments de RCMLA de taille comparable à deux segments adjacents, tel que souhaité. Après plusieurs essais, la méthode utilisée et présentée dans cette section a comme avantage l'obtention facile d'échantillons assez purs pour l'analyse par spectroscopie de masse, qui constitue la prochaine étape de la recherche sur DnaK et RCMLA. L'organigramme des manipulations nécessaires à son obtention est présenté comme la figure 3.13. Sur ce même organigramme sont inscrits les numéros des puits correspondants à l'échantillon à quelques étapes des manipulations de plus grand intérêt.

Après avoir formé le complexe de RCMLA/DnaK en laissant incuber à 37°C pour 30 minutes, l'échantillon est digéré par la trypsine 1/1000 w/w par rapport à la masse totale de protéine. On arrête alors la réaction avec du PMSF, un inhibiteur des protéases à serine et on filtre le tout sur un concentrateur Microcon d'exclusion de 30 kDa. Le filtrat est ainsi composé uniquement de fragments de RCMLA n'ayant pas interagi avec DnaK. Ce qui est resté sur le filtre est alors traité de la façon suivante : on dissocie les complexes formés entre DnaK et RCMLA (ou ses fragments) par l'ajout d'ATP, qui libère les protéines en moins de 2 minutes (voir figure 3.3) et par l'acidification par l'acide acétique jusqu'à l'obtention d'un pH = 3,0. On filtre de nouveau la solution sur un autre concentrateur de 30kDa et on conserve le filtrat, qui est composé de segments de DnaK et fragments de RCMLA ayant été liés à DnaK. Les régions de RCMLA que l'on obtient ici contiennent donc tous les sites de liaisons de DnaK sur la RCMLA. Les filtrats sont finalement précipités avec de l'acide



**Figure 3.13 : Organigramme des manipulations menant à l'identification des sites de liaison.** L'objectif est de séparer les fragments de RCMLA qui lient DnaK et ceux qui restent libre. Les dernières étapes des manipulations sont le gel de polyacrylamide (dont les contenus des puits 3, 4 et 5 sont inscrits sur l'organigramme) et la spectroscopie de masse, qui seront les deux modes de détection des fragments.

trichloroacétique (TCA) 15% pour au moins une heure et mis sur gel (figure 3.14) avec le tampon de chargement. La solution qui est demeurée sur le filtre à la seconde filtration est chargée sur un puits du gel à des fins de contrôle. Tel que prévu, cette fraction ne contient que des molécules de DnaK entières.



**Figure 3.14 : Gel (Tris-tricine, à 16,5% de polyacrylamide) de digestion par la trypsine du complexe RCMLA/DnaK révélé par coloration à l'argent.** La coloration à l'argent a été réalisée avec la trousse Bio-rad. Le puits dont la moitié est visible à gauche contient un mélange standard de polypeptides dont la masse moléculaire est inscrite à gauche. Le puits 1 contient la RCMLA native et le deuxième, la même quantité de RCMLA sur laquelle la trypsine a agi. Les puits 3 et 4 sont les échantillons filtrés et récoltés sur le filtre, respectivement, pour ne garder que les fragments de RCMLA (voir figure 3.13). Le puits 5 est l'échantillon récolté sur le filtre après dissociation du complexe. Le puits 6 donne un aperçu des fragments de DnaK pouvant être générés par un excès de trypsine.

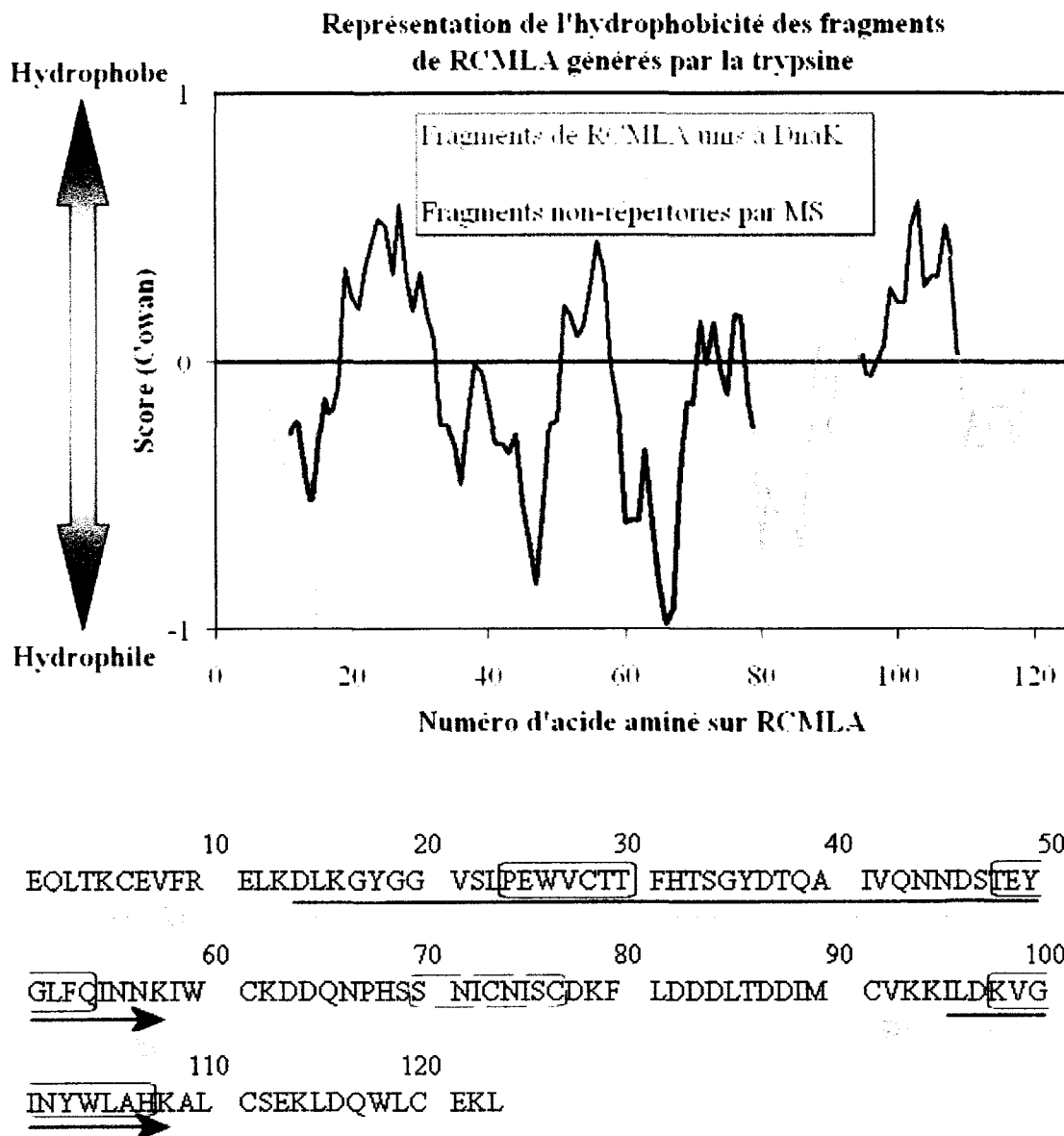
Pour éviter la présence de RCMLA libre après l'incubation visant à favoriser l'interaction des protéines, les échantillons contenaient DnaK en excès important. La figure 3.5 a permis de déterminer la concentration de DnaK saturante par rapport à celle

de RCMLA et les mêmes quantités de protéines ont été reproduites pour la présente expérience. Ainsi, pour aussi peu que 8,4 $\mu$ g de RCMLA en solution, 1,24mg de DnaK étaient utilisés pour saturer le complexe et, après de nombreuses pertes protéiques dues à plusieurs manipulations, une quantité infime de RCMLA est présente sur le gel, c'est pourquoi la coloration à l'argent a été utilisée. Un si grand écart de quantités des protéines oblige aussi l'utilisation d'un grand volume d'échantillon pour que la chaperonne ne soit pas trop concentrée et ainsi éviter qu'elle s'agrège avec elle-même. L'échantillon était donc d'un volume de 1,5ml et la précipitation au TCA fut utilisée pour réduire le volume de l'échantillon à mettre sur le gel. Le puits 4 du gel est celui contenant les fragments de RCMLA qui ont été liés à DnaK. De nombreuses bandes sont aperçues dans la région de 0,5 à 3 kDa mais il est malheureusement impossible de discerner les tailles des fragments pour ainsi déduire l'identité de ces fragments. On a dû recourir à la spectroscopie de masse pour enfin procéder à la reconnaissance des fragments renfermant les sites de liaison de DnaK.

### **3.5.3 Identification des fragments de RCMLA contenant les sites de liaison de DnaK par spectroscopie de masse.**

Les bandes du puits 4 du gel de la figure 3.14 ont été analysées par spectroscopie de masse, en plus d'une expérience contrôle réalisée de la même façon (protéolyse, filtration, dissociation, filtration, précipitation) que l'échantillon mais avec RCMLA seulement, sans DnaK (puits 2). De cette façon, on dissocie les fragments de RCMLA qui ne sont pas retrouvés dans l'échantillon du complexe pour cause de liaison à DnaK de ceux qui sont absents des résultats parce que l'appareil ne les a pas détectés. Les limitations de l'appareil comprennent entre autres la taille des polypeptides insérés et le pH de l'échantillon. Les fragments de moins de 500 Da sont invisibles et la situation est semblable lorsque la composition en acides aminés induit des charges globales contraires à celles provoquées par l'ionisation.

La figure 3.15 montre la séquence de la lactalbumine avec les fragments enregistrés par le spectromètre de masse indiqués par des flèches. Une analyse sommaire de l'hydrophobicité des acides aminés composant les différents fragments



**Figure 3.15 : Identification par spectrométrie de masse des fragments de RCMLA contenant un site d'union à DnaK.** En haut, graphique de l'hydrophobicité de la séquence de RCMLA par l'échelle de Cowan pH = 7,5 (HPLC, base de données ProtScale du serveur ExPASy (Expert Protein Analysis System) proteomics). Les fragments retrouvés dans l'échantillon correspondant au puits 4 sur la figure 3.14 sont en bleu et ceux de la protéolyse de RCMLA sans DnaK en jaune. En bas, la séquence de la lactalbumine est présentée avec les fragments répertoriés par spectrométrie de masse, selon le même code de couleur.

obtenus de la protéolyse y est également présentée. Les deux segments de RCMLA qui ont été unis à DnaK possèdent également les acides aminés les plus hydrophobes de la protéine. La séquence-cible des substrats de DnaK a déjà été étudiée sur de courts peptides aux propriétés physiques différentes. Tel que décrit aux sections 1.4.2 et 1.4.3, la chaperonne a présenté une préférence pour les peptides ayant un site hautement hydrophobe, composé de 3 à 5 acides aminés volumineux, et flanqués des deux côtés par un ou des acides aminés hydrophiles ou chargés positivement. La RCMLA possède quelques sites correspondant à cette description. Le segment des acides aminés 14 à 58 est particulièrement grand et pourrait bien être porteur de deux molécules de DnaK. Deux sites hydrophobes y sont présents. Le fragment des acides aminés 95 à 108 est aussi hydrophobe et les plus volumineux, YWL, sont entourés de deux acides aminés hydrophiles. Les résultats de titrage calorimétrique isotherme ayant chiffré à quatre le nombre de sites de liaison de DnaK sur la RCMLA, on pourrait être tenté de rechercher un quatrième site hydrophobe dans la séquence de RCMLA. Bien que ce ne soit que de la spéculation, le site manquant pourrait bien être compris dans la section des acides aminés 59 à 79, invisible à la spectroscopie de masse et détenteur d'un emplacement légèrement hydrophobe, selon l'échelle de Cowan. Les sites les plus probables ont été déterminés en se basant sur les propriétés physiques des acides aminés et par l'hydrophobicité mise en valeur par le graphique.

On convient du fait que les résultats obtenus dans cette section ont une valeur semi-quantitative. L'interaction entre RCMLA et DnaK est dynamique, et certains sites de liaisons sont vraisemblablement plus privilégiés que d'autres. Une liaison de DnaK incomplète ou une situation où seulement certains sites sont occupés pourrait expliquer plusieurs résultats, tels que la présence de deux complexes de taille différente sur les gels avec agents pontants et les gels natifs (section 3.3). Même si la liaison est gérée par l'enthalpie, l'entropie y joue un rôle important (section 3.4), particulièrement dans les conditions de stress physiologique.

Une si grande sensibilité aux conditions du milieu (section 3.1), caractéristique d'interactions où l'hydrophobicité joue un grand rôle, peut aussi influencer pour former différents complexes, composés de différents ratios protéiques. La piste venant de



l'observation d'un complexe entre DnaK et RCMLA favorisé par un ratio RCMLA : DnaK plus élevé (section 3.3) est prometteuse. Finalement, le nombre de sites de liaison de DnaK sur RCMLA nettement supérieur à un (section 3.4) et l'identification de plusieurs sites de liaisons probables par spectroscopie de masse (section 3.5) achèvent de prouver la validité de l'hypothèse de «holdase ».

## **CHAPITRE 4 :**

### **INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS**

#### **4.1 Interprétation de la caractérisation du complexe et de sa stabilité**

Dans la section 3.1 étaient présentés les résultats prouvant l'existence du complexe et les conditions optimales de sa formation. On y a d'abord remarqué que la température optimale pour la création d'un complexe entre la RCMLA et DnaK était de 37°C. On pourrait s'étonner de la présence maximale du complexe à une température physiologique, mais ce résultat n'est pas en contradiction avec le principe fonctionnel des protéines de choc thermique. Rappelons tout d'abord que la majorité des Hsps sont présentes à la fois de façon constitutive et lors de chocs thermiques, comme c'est le cas de DnaK, dont la quantité cellulaire passe de 1 à 3% des protéines totales lorsque la température augmente. Aussi, certaines de ses fonctions se produisent plus spécifiquement lors d'un stress cellulaire alors que d'autres sont accomplies quelle que soit la température (91, 92). Le complexe qui se forme entre la RCMLA et DnaK est, selon le mode d'action proposé, multifonctionnel en lui-même. Par conséquent, il est justifiable que l'interaction entre les deux protéines doive se produire à la fois dans des conditions cellulaires physiologiques et lors de stress.

Dans cette même section a été enregistrée la caractérisation du complexe par les nucléotides. Cette expérience a permis de vérifier le temps d'incubation des deux protéines en présence d'ADP nécessaire à la saturation du complexe et de prouver la spécificité de la liaison entre DnaK et la RCMLA. Le complexe obtenu de cette façon intrigue par sa lenteur à se former en présence d'ADP. Une liaison qui tarde autant à se former a-t-elle des chances de se produire réellement dans une cellule dans laquelle la concentration d'ATP est beaucoup plus élevée que celle d'ADP ? Nous croyons que ce complexe est présent *in vivo* parce que les conditions cinétiques y sont considérablement différentes. D'abord, la présence des deux co-chaperonnes modifie grandement l'affinité de DnaK pour le substrat. Si chacune d'elles augmente l'une

et l'autre de plusieurs milliers de fois la vitesse d'échange de nucléotide, leur liaison à DnaK varie selon la température (93, 94). Ainsi, suivant la nouvelle théorie selon laquelle l'échangeur de nucléotides GrpE serait aussi le senseur thermique du système de DnaK, une température élevée favoriserait fortement la forme avec ATP de DnaK. Une quantité d'autres variables dans la cellule ont une influence sur la cinétique d'association et de dissociation des nucléotides ainsi que sur l'interaction avec le substrat. Par conséquent, l'information cinétique contenue dans cette expérience ne peut pas être transposée *in vivo*. Elle permet tout de même de constater l'importance d'un temps d'incubation de la RCMLA et de DnaK en présence d'ADP nécessaire à l'équilibre et montre la spécificité de la liaison chaperonne-substrat, dépendante des nucléotides.

La stabilité du complexe formé et sa dynamique de dissociation ont ensuite été étudiées (section 3.2). Les figures 3.5 et 3.6 ont mené à l'obtention de la constante de dissociation par des mesures d'anisotropie de fluorescence. La valeur du  $K_d$  enregistrée et confirmée par la suite par les mesures calorimétriques est de l'ordre de  $1\mu\text{M}$ . L'information la plus importante que procure la constante de dissociation se situe au niveau de sa comparaison avec le  $K_d$  obtenu avec le même substrat pour la famille des chaperonines.

La constante de dissociation du complexe de GroEL et RCMLA est de l'ordre de  $1\text{nM}$  (95), soit 1000 fois plus petite que celle de DnaK avec la RCMLA. On s'imagine aisément que si les deux chaperonnes se retrouvent en présence du substrat, l'équilibre sera déplacé pour favoriser l'insertion de la RCMLA à l'intérieur de GroEL. Cette observation est complètement compatible avec l'hypothèse de «holdase» qu'on souhaite prouver. En effet, dans cette théorie, il est implicite que l'existence du complexe DnaK-RCMLA doive être temporaire, puisque l'une des fonctions de DnaK est de transférer le substrat. Elle doit donc céder volontiers la RCMLA à une autre famille de chaperonnes, ce qui est vraisemblablement le cas avec GroEL. Une certaine stabilité temporelle (prouvée par l'expérience de la figure 3.4) est tout de même nécessaire au

complexe pour certaines fonctions. Le complexe peut se maintenir pour le temps nécessaire à la traduction et DnaK réussit alors à protéger le substrat. De la même façon, diriger le substrat jusqu'à l'organelle appropriée requiert également un complexe relativement stable.

La stabilité du complexe est donc tout à fait compatible avec la théorie de « holdase ». Une association assez forte est observée mais la dissociation survient en présence d'une chaperonne pouvant accueillir le substrat.

#### **4.2 Complexes à différents ratios protéiques initiaux**

Cette section comparera les résultats des figures 3.7, 3.8 et 3.9 et examinera des aspects particuliers des expériences. Les trois figures représentent des séparations selon la taille du complexe et de ses constituants en vérifiant l'effet de proportions initiales variées de chacun. À prime abord, il pourrait sembler étonnant qu'on n'ait pas cherché à déduire le nombre de molécules de DnaK liées à la RCMLA par la masse du complexe apparaissant sur ces figures. Cependant, les supports utilisés pour séparer les protéines (gels de polyacrylamide et résine formée de billes de silicium) ne font pas la distinction entre la masse et la forme. La séparation est basée sur le principe que les constituants ont des formes globulaires semblables les unes aux autres, comme le sont les marqueurs de poids moléculaires. Le cas du complexe de la RCMLA et de DnaK est distinct : la lactalbumine est, lorsque liée à DnaK, sous forme linéaire. Le modèle prédit une forme de complexe s'avoisinant davantage à une corde nouée à plusieurs endroits qu'à une balle de laine compacte. Le complexe ainsi formé réussit vraisemblablement à se faufiler autour des billes de silicium ou au travers des pores du gel de polyacrylamide plus facilement que le ferait une molécule de même poids moléculaire mais plus compacte. Le poids moléculaire apparent du complexe doit donc être plus faible que sa valeur réelle.

Cette forme pourrait bien être celle du complexe mais plus difficilement celle de la RCMLA libre. Dans ce cas, il est peu probable que la RCMLA adopte une forme

complètement linéaire, ce serait la liaison des molécules de DnaK qui lui donnerait cette conformation. Une telle approche adoptée par la chaperonne serait à l'origine d'un type de coopérativité dans la liaison des molécules de DnaK à celle de RCMLA. Les sites de liaisons seraient alors de plus en plus exposés quand d'autres sites sont occupés par DnaK. En se référant à la figure 3.8, en surplus au complexe visible entre 67 et 140kDa, on remarque une bande de poids moléculaire plus élevé fluorescente au transilluminateur. Cette seconde bande pourrait correspondre à un second complexe composé d'un plus grand nombre de molécules de DnaK par RCMLA. La présence possible de deux complexes pourrait être reliée au concept de coopérativité, le premier assemblage permettant la formation du deuxième.

Les éléments relevés dans la présente section sont spéculatifs, d'autres expériences devront être réalisées pour prouver leur validité. Ce que la section correspondante des résultats a pu prouver est que l'association des deux protéines mène à un complexe dont l'abondance est plus grande lorsque le ratio RCMLA/DnaK baisse.

### **4.3 Les données thermodynamiques et leur signification**

Les valeurs thermodynamiques de la liaison entre la RCMLA et DnaK ont été déterminées par titrage calorimétrique isotherme. Rappelons que les résultats présentés aux figures 3.10 et 3.11 sont obtenus en soustrayant le titrage de l'injection de la RCMLA en absence de DnaK mais dans les mêmes conditions, le titrage est donc celui de la liaison et les valeurs thermodynamiques sont spécifiques à l'interaction entre les protéines. Ces résultats sont groupés au tableau 4.1.

S'il y a apparemment plus de chaperonnes se liant à la RCMLA lorsque la température est plus élevée, la dissociation est aussi plus fréquente. Comme DnaK a une tendance à se regrouper en dimères *in vitro* à température plus élevée (96, 97), il est possible que le  $n$  mesuré à 42°C ne reflète pas adéquatement le nombre de chaperonnes liées à la RCMLA. Les points saillants de l'influence de la variation de température sur le système incluent la dissociation plus élevée, une hausse marquée de la contribution

**Tableau 0.1 : Résumé des données thermodynamiques**

	Anisotropie (37°C)	ITC (37°C)	ITC (42°C)
<b>n</b>		4,50 ± 0,23	6,02 ± 0,53
<b>K<sub>d</sub></b> (μM)	0,75 ± 0,24	1,08 ± 0,26	1,70 ± 0,30
<b>ΔH</b> (kcal/mol)		-14,53 ± 0,11	-31,95 ± 0,39
<b>ΔS</b> (cal/mol K)		-19,4	-75,0
<b>ΔG</b> (kcal/mol)		-8,51	-8,31

entropique à la liaison lors d'un choc thermique et une différence modérée du changement enthalpique de l'association des protéines.

Il est bien connu que le mode d'action des chaperonnes moléculaires implique des interactions de type hydrophobe entre la chaperonne et son substrat protéique (5). Ainsi, on pourrait s'étonner des résultats obtenus par le calorimètre au niveau de l'enthalpie et de l'entropie. Cependant, la présence d'interactions hydrophobes d'origine entropique ne signifie pas que l'enthalpie ne contribue pas fortement à l'association des protéines entre elles. De plus, l'entropie défavorable pour le substrat (RCMLA) peut être au contraire très favorable à l'enzyme (DnaK), en raison de son hydrophobicité. Rappelons brièvement l'hypothèse de travail explicitée dans l'introduction. DnaK accomplirait sa fonction de chaperonne en se liant à plusieurs sur un même substrat. La théorie de « holdase » stipule que le ligand est par son action privé de sa structure tertiaire et parfois même de sa structure secondaire. La protéine-substrat repliée sur elle-même est forcée au dépliement par la chaperonne, pour des interactions avec la chaperonne qui ne sont pas nécessairement plus propices énergétiquement pour elle que les interactions que le substrat faisait sur lui-même. Malheureusement, le titrage calorimétrique isotherme ne permet pas de diviser les processus de dépliement de la RCMLA et de liaison à la chaperonne puisque c'est l'enzyme qui provoque le processus de dépliement.

#### **4.4 L'identification des sites de liaison**

La méthode utilisée pour identifier les sites sur la séquence de la RCMLA n'est sans doute pas la plus efficace. Elle permet de définir les régions abritant au moins un site de liaison mais ne permet pas d'en déduire la quantité ni d'identifier la totalité des sites puisque certains segments ne sont pas révélés par la spectroscopie de masse. Les prochaines études traitant du sujet devraient considérer l'amélioration de la technique par la répétition de l'expérience avec plus d'une protéase ou en variant les contraintes du spectromètre de masse. Une autre façon de réaliser l'expérience serait le retrait d'une partie du contenu de l'échantillon avant dissociation du complexe pour l'observer sur un gel natif, permettant ainsi de vérifier si plus d'une molécule de DnaK sont présentes sur un segment.

L'avantage de la méthode est que la spécificité des sites de liaison trouvés est prouvée pendant l'expérience puisque le complexe est dissocié en utilisant de l'ATP, les molécules de DnaK soustraites de la solution étaient donc liées à la RCMLA par le SBD. Quatre sites présentant les caractéristiques décrites à la section 1.4.3 ont été repérés sur la séquence de la RCMLA. Dans cette même section, on avait reporté qu'une séquence contenant la majorité des particularités de cette séquence-cible étaient retrouvés statistiquement tous les 36 acides aminés alors que celles présentant toutes les caractéristiques existaient à chaque 84 résidus. Sur la séquence de 123 acides aminés de la lactalbumine, la liaison de quatre molécules de DnaK souligne qu'il y a un site pour 31 résidus, ce qui en fait un modèle adéquat pour la représentation d'une variété de protéines. Comme DnaK a une affinité différente pour chacun des sites dépendant de la séquence de la cible, il est normal que certains sites ne présentent pas toutes les caractéristiques recherchées. Il est tout de même concevable, en se basant sur l'affinité pour DnaK, même réduite, d'une grande variété de peptides (figure 1.9), que les quatre régions de RCMLA prises en charge par DnaK soient les cibles recherchées.

#### **4.5 Perspectives de recherche**

Les expériences relatées dans ce document ont permis de mettre en évidence que plusieurs molécules de DnaK se lient à une seule de RCMLA, et que cette liaison est

assez faible pour réaliser le transfert de la RCMLA vers le système de GroEL. Ces preuves expérimentales tendent vers une même conclusion : DnaK peut agir selon un mécanisme d'action de type « holdase » sur la RCMLA. Afin de compléter la preuve de l'existence d'un tel mode d'action et pour déterminer plus précisément les cas où un tel système serait utilisé par la cellule, il serait nécessaire de répéter les manipulations avec d'autres substrats. Comme précisé dans l'introduction, la difficulté du choix des substrats vient de la nécessité de travailler avec un polypeptide dénaturé. D'abord, d'autres substrats pourraient sûrement être réduits et carboxyméthylés pour imiter le polypeptide en élongation, même s'ils ne sont pas aussi disponibles et caractérisés que la RCMLA. Il n'est tout de même pas dénué d'intérêt de réaliser l'expérience sur un polypeptide qui ne posséderait pas la conformation allongée mais tout de même une structure peu compacte.

Par exemple, la malate déshydrogénase, une petite protéine reconnue comme un substrat par DnaK, pourrait être une bonne candidate. Par rapport à la lactalbumine, elle présente l'avantage de permettre de vérifier si elle retrouve son état natif par des mesures d'activité enzymatique.

Cet élément n'est pas négligeable puisqu'il se pourrait que le mode d'action de « holdase » ait une fonction supplémentaire à celles de protection du polypeptide et de direction vers d'autres chaperonnes et organelles, telles que décrites à la section 1.5.2. En effet, plusieurs pensent que le mécanisme pourrait être un mode de repliement en soi, n'utilisant ni ATP ni cofacteurs (98, 99). Si DnaK n'effectuait alors aucun mouvement sur le polypeptide, elle ralentirait tout de même son repliement en se retirant progressivement du substrat. Les sites ayant moins d'affinité pour la chaperonne seraient alors libre d'interagir en premier, avant que les sites à haute affinité soient libérés. Cette théorie expliquerait que certains substrats puissent être repliés sous l'action de DnaK agissant seule, sans ses cofacteurs. Encore une fois, il faut préciser que chaque substrat est différent et que les voies utilisées par les chaperonnes ne sont pas toutes les mêmes, certains polypeptides seront repliés d'une façon alors que d'autres le seront différemment.



À un moment de la réalisation de ce travail, une branche secondaire de recherche qu'il vaut la peine de souligner a été envisagée. Il s'agissait d'étudier le transfert de substrat de ClpB à DnaK, puis à GroEL en exploitant la fluorescence de la fluorescéine attachée de côté N-terminal de la RCMLA. On prévoyait former le complexe entre ClpB et la RCMLA et l'isoler pour ensuite y ajouter DnaK. Par la suite, si effectivement le substrat était transféré, on aurait répété les manipulations en y incorporant GroEL. La fluorescence aurait été utilisée pour repérer les complexes facilement. Si l'idée de projet a été abandonnée à ce point pour des raisons techniques, sa réalisation serait d'un grand intérêt à la fois pour renforcer la preuve du transfert de substrat entre les chaperonnes et pour soutenir l'importance de la théorie de « holdase ».

À ces quelques expériences pourrait être ajoutée une liste exhaustive d'idées de recherche aussi variées qu'intéressantes. Très peu de publications sont disponibles sur la caractérisation structurale des substrats pris en charge par les chaperonnes moléculaires. Que ce soit au niveau de l'étude des modes d'action des chaperonnes ou plutôt dans le but d'évaluer les interactions entre elles, les perspectives d'études sont nombreuses.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Fulton, A.B., Wan, K.M., *Many cytoskeletal proteins associate with the hela cytoskeleton during translation in vitro*. Cell. **32**(2): p. 619-25(1983).
2. Partikian, A., Olveczky, B., Swaminathan, R., Li, Y., Verkman, A.S., *Rapid diffusion of green fluorescent protein in the mitochondrial matrix*. J Cell Biol. **140**(4): p. 821-9(1998).
3. Swaminathan, R., Hoang, C.P., Verkman, A.S., *Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translational and rotational diffusion*. Biophys J. **72**(4): p. 1900-7(1997).
4. Goodsell, D.S., *Inside a living cell*. Trends Biochem Sci. **16**(6): p. 203-6(1991).
5. Houry, W.A., *Chaperone-Assisted Protein Folding in the Cell Cytoplasm*. Current Protein and Peptide Science. **2**: p. 227-244(2001).
6. Walter, S., Buchner, J., *Molecular chaperones--cellular machines for protein folding*. Angew Chem Int Ed Engl. **41**(7): p. 1098-113(2002).
7. Laskey, R.A., Honda, B.M., Mills, A.D., Finch, J.T., *Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA*. Nature. **275**(5679): p. 416-20(1978).
8. Ellis, J., *Proteins as molecular chaperones*. Nature. **328**(6129): p. 378-9(1987).
9. Dill, K.A., *Dominant forces in protein folding*. Biochemistry. **29**(31): p. 7133-55(1990).
10. Lazaridis, T., Karplus, M., *Thermodynamics of protein folding: a microscopic view*. Biophys Chem. **100**(1-3): p. 367-95(2003).

11. Anfinsen, C.B., *Principles that govern the folding of protein chains*. Science. **181**(96): p. 223-30(1973).
12. Lehmann, M., Loch, C., Middendorf, A., Studer, D., Lassen, S.F., Pasamontes, L., van Loon, A.P., Wyss, M., *The consensus concept for thermostability engineering of proteins: further proof of concept*. Protein Eng. **15**(5): p. 403-11(2002).
13. Hartl, F.U., *Molecular chaperones in cellular protein folding*. Nature. **381**(6583): p. 571-9(1996).
14. Buchner, J., and Kiefhaber, T., *Protein folding handbook*. Vol. 3. 2005, Weinheim: Wiley-Vch. 162-196.
15. Hendrick, J.P., Hartl, F.U., *Molecular chaperone functions of heat-shock proteins*. Annu Rev Biochem. **62**: p. 349-84(1993).
16. Hendrix, R.W., *Purification and properties of groE, a host protein involved in bacteriophage assembly*. J Mol Biol. **129**(3): p. 375-92(1979).
17. Horst, R., Bertelsen, E.B., Fiaux, J., Wider, G., Horwich, A.L., Wuthrich, K., *Direct NMR observation of a substrate protein bound to the chaperonin GroEL*. Proc Natl Acad Sci U S A. **102**(36): p. 12748-53(2005).
18. Hemmingsen, S.M., Ellis, R.J., *Purification and Properties of Ribulosebiphosphate Carboxylase Large Subunit Binding Protein*. Plant Physiol. **80**(1): p. 269-276(1986).
19. Kerner, M.J., Naylor, D.J., Ishihama, Y., Maier, T., Chang, H.C., Stines, A.P., Georgopoulos, C., Frishman, D., Hayer-Hartl, M., Mann, M., Hartl, F.U., *Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in Escherichia coli*. Cell. **122**(2): p. 209-20(2005).

20. Gruschus, J.M., Greene, L.E., Eisenberg, E., Ferretti, J.A., *Experimentally biased model structure of the Hsc70/auxilin complex: substrate transfer and interdomain structural change*. Protein Sci. **13**(8): p. 2029-44(2004).
21. Kedzierska, S., Chesnokova, L.S., Witt, S.N., Zolkiewski, M., *Interactions within the ClpB/DnaK bi-chaperone system from Escherichia coli*. Arch Biochem Biophys. **444**(1): p. 61-5(2005).
22. Mogk, A., Tomoyasu, T., Goloubinoff, P., Rudiger, S., Roder, D., Langen, H., Bukau, B., *Identification of thermolabile Escherichia coli proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB*. Embo J. **18**(24): p. 6934-49(1999).
23. Zietkiewicz, S., Krzewska, J., Liberek, K., *Successive and synergistic action of the Hsp70 and Hsp100 chaperones in protein disaggregation*. J Biol Chem. **279**(43): p. 44376-83(2004).
24. Cheetham, M.E., Caplan, A.J., *Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function*. Cell Stress Chaperones. **3**(1): p. 28-36(1998).
25. Jordan, R., McMacken, R., *Modulation of the ATPase activity of the molecular chaperone DnaK by peptides and the DnaJ and GrpE heat shock proteins*. J Biol Chem. **270**(9): p. 4563-9(1995).
26. Brychzy, A., Rein, T., Winklhofer, K.F., Hartl, F.U., Young, J.C., Obermann, W.M., *Cofactor Tpr2 combines two TPR domains and a J domain to regulate the Hsp70/Hsp90 chaperone system*. Embo J. **22**(14): p. 3613-23(2003).
27. Wegele, H., Wandinger, S.K., Schmid, A.B., Reinstein, J., Buchner, J., *Substrate transfer from the chaperone Hsp70 to Hsp90*. J Mol Biol. **356**(3): p. 802-11(2006).
28. Lindquist, S., Craig, E.A., *The heat-shock proteins*. Annu Rev Genet. **22**: p. 631-77(1988).

29. Calabrese, V., Sultana, R., Scapagnini, G., Guagliano, E., Sapienza, M., Bella, R., Kanski, J., Pennisi, G., Mancuso, C., Stella, A.M., Butterfield, D.A., *Nitrosative stress, cellular stress response, and thiol homeostasis in patients with Alzheimer's disease*. *Antioxid Redox Signal*. **8**(11-12): p. 1975-86(2006).
30. Laki, J., Laki, I., Nemeth, K., Ujhelyi, R., Bede, O., Endreffy, E., Bolbas, K., Gyurkovits, K., Csiszer, E., Solyom, E., Dobra, G., Halasz, A., Pozsonyi, E., Rajczy, K., Prohaszka, Z., Fekete, G., Fust, G., *The 8.1 ancestral MHC haplotype is associated with delayed onset of colonization in cystic fibrosis*. *Int Immunol*. **18**(11): p. 1585-90(2006).
31. Krojer, T., Garrido-Franco, M., Huber, R., Ehrmann, M., Clausen, T., *Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine*. *Nature*. **416**(6879): p. 455-9(2002).
32. Hoskins, J.R., Wickner, S., *Two peptide sequences can function cooperatively to facilitate binding and unfolding by ClpA and degradation by ClpAP*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**(4): p. 909-14(2006).
33. Beckmann, R.P., Mizzen, L.E., Welch, W.J., *Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly*. *Science*. **248**(4957): p. 850-4(1990).
34. Rudiger, S., Mayer, M.P., Schneider-Mergener, J., Bukau, B., *Modulation of substrate specificity of the DnaK chaperone by alteration of a hydrophobic arch*. *J Mol Biol*. **304**(3): p. 245-51(2000).
35. Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A.P., Tomoyasu, T., Bukau, B., *Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**(24): p. 13732-7(1999).
36. Guisbert, E., Herman, C., Lu, C.Z., Gross, C.A., *A chaperone network controls the heat shock response in E. coli*. *Genes Dev*. **18**(22): p. 2812-21(2004).

37. Chirico, W.J., Waters, M.G., Blobel, G., *70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes*. *Nature*. **332**(6167): p. 805-10(1988).
38. Bole, D.G., Hendershot, L.M., Kearney, J.F., *Posttranslational association of immunoglobulin heavy chain binding protein with nascent heavy chains in nonsecreting and secreting hybridomas*. *J Cell Biol*. **102**(5): p. 1558-66(1986).
39. Jiang, J., Prasad, K., Lafer, E.M., Sousa, R., *Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 chaperone*. *Mol Cell*. **20**(4): p. 513-24(2005).
40. Revington, M., Zhang, Y., Yip, G.N., Kurochkin, A.V., Zuiderweg, E.R., *NMR investigations of allosteric processes in a two-domain Thermus thermophilus Hsp70 molecular chaperone*. *J Mol Biol*. **349**(1): p. 163-83(2005).
41. Moro, F., Fernandez-Saiz, V., Muga, A., *The lid subdomain of DnaK is required for the stabilization of the substrate-binding site*. *J Biol Chem*. **279**(19): p. 19600-6(2004).
42. Chesnokova, L.S., Witt, S.N., *Switches, catapults, and chaperones: steady-state kinetic analysis of Hsp70-substrate interactions*. *Biochemistry*. **44**(33): p. 11224-33(2005).
43. Revington, M., Holder, T.M., Zuiderweg, E.R., *NMR study of nucleotide-induced changes in the nucleotide binding domain of Thermus thermophilus Hsp70 chaperone DnaK: implications for the allosteric mechanism*. *J Biol Chem*. **279**(32): p. 33958-67(2004).
44. Moro, F., Fernandez-Saiz, V., Muga, A., *The allosteric transition in DnaK probed by infrared difference spectroscopy. Concerted ATP-induced rearrangement of the substrate binding domain*. *Protein Sci*. **15**(2): p. 223-33(2006).

45. Silberg, J.J., Vickery, L.E., *Kinetic characterization of the ATPase cycle of the molecular chaperone Hsc66 from Escherichia coli*. J Biol Chem. **275**(11): p. 7779-86(2000).
46. Slepenkov, S.V., Witt, S.N., *The unfolding story of the Escherichia coli Hsp70 DnaK: is DnaK a holdase or an unfoldase?* Mol Microbiol. **45**(5): p. 1197-206(2002).
47. Landry, S.J., *Swivels and stators in the Hsp40-Hsp70 chaperone machine*. Structure. **11**(12): p. 1465-6(2003).
48. Hesterkamp, T., Bukau, B., *Role of the DnaK and HscA homologs of Hsp70 chaperones in protein folding in E.coli*. Embo J. **17**(16): p. 4818-28(1998).
49. Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W.F., Gragerov, A., Ogata, C.M., Gottesman, M.E., Hendrickson, W.A., *Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK*. Science. **272**(5268): p. 1606-14(1996).
50. Harrison, C.J., Hayer-Hartl, M., Di Liberto, M., Hartl, F., Kuriyan, J., *Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK*. Science. **276**(5311): p. 431-5(1997).
51. Russell, R., Jordan, R., McMacken, R., *Kinetic characterization of the ATPase cycle of the DnaK molecular chaperone*. Biochemistry. **37**(2): p. 596-607(1998).
52. Theyssen, H., Schuster, H.P., Packschies, L., Bukau, B., Reinstein, J., *The second step of ATP binding to DnaK induces peptide release*. J Mol Biol. **263**(5): p. 657-70(1996).
53. Zhang, Y., Zuiderweg, E.R., *The 70-kDa heat shock protein chaperone nucleotide-binding domain in solution unveiled as a molecular machine that can reorient its functional subdomains*. Proc Natl Acad Sci U S A. **101**(28): p. 10272-7(2004).

54. Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M.K., Hartl, F.U., *Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding*. Nature. **356**(6371): p. 683-9(1992).
55. Schroder, H., Langer, T., Hartl, F.U., Bukau, B., *DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage*. Embo J. **12**(11): p. 4137-44(1993).
56. Szabo, A., Korszun, R., Hartl, F.U., Flanagan, J., *A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates*. Embo J. **15**(2): p. 408-17(1996).
57. Mehl, A.F., Heskett, L.D., Jain, S.S., Demeler, B., *Insights into dimerization and four-helix bundle formation found by dissection of the dimer interface of the GrpE protein from Escherichia coli*. Protein Sci. **12**(6): p. 1205-15(2003).
58. Gelinas, A.D., Langsetmo, K., Toth, J., Bethoney, K.A., Stafford, W.F., Harrison, C.J., *A structure-based interpretation of E.coli GrpE thermodynamic properties*. J Mol Biol. **323**(1): p. 131-42(2002).
59. Grimshaw, J.P., Jelesarov, I., Schonfeld, H.J., Christen, P., *Reversible thermal transition in GrpE, the nucleotide exchange factor of the DnaK heat-shock system*. J Biol Chem. **276**(9): p. 6098-104(2001).
60. Grimshaw, J.P., Jelesarov, I., Siegenthaler, R.K., Christen, P., *Thermosensor action of GrpE. The DnaK chaperone system at heat shock temperatures*. J Biol Chem. **278**(21): p. 19048-53(2003).
61. Moro, F., Muga, A., *Thermal adaptation of the yeast mitochondrial Hsp70 system is regulated by the reversible unfolding of its nucleotide exchange factor*. J Mol Biol. **358**(5): p. 1367-77(2006).
62. Siegenthaler, R.K., Grimshaw, J.P., Christen, P., *Immediate response of the DnaK molecular chaperone system to heat shock*. FEBS Lett. **562**(1-3): p. 105-10(2004).



63. Rudiger, S., Schneider-Mergener, J., Bukau, B., *Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone.* Embo J. **20**(5): p. 1042-50(2001).
64. Fourie, A.M., Sambrook, J.F., Gething, M.J., *Common and divergent peptide binding specificities of hsp70 molecular chaperones.* J Biol Chem. **269**(48): p. 30470-8(1994).
65. Reineke, U., Sabat, R., Kramer, A., Stigler, R.D., Seifert, M., Michel, T., Volk, H.D., Schneider-Mergener, J., *Mapping protein-protein contact sites using cellulose-bound peptide scans.* Mol Divers. **1**(3): p. 141-8(1996).
66. Rudiger, S., Germeroth, L., Schneider-Mergener, J., Bukau, B., *Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries.* Embo J. **16**(7): p. 1501-7(1997).
67. Kurt, N., Rajagopalan, S., Cavagnero, S., *Effect of hsp70 chaperone on the folding and misfolding of polypeptides modeling an elongating protein chain.* J Mol Biol. **355**(4): p. 809-20(2006).
68. Deuerling, E., Schulze-Specking, A., Tomoyasu, T., Mogk, A., Bukau, B., *Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins.* Nature. **400**(6745): p. 693-6(1999).
69. Teter, S.A., Houry, W.A., Ang, D., Tradler, T., Rockabrand, D., Fischer, G., Blum, P., Georgopoulos, C., Hartl, F.U., *Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains.* Cell. **97**(6): p. 755-65(1999).
70. Palleros, D.R., Shi, L., Reid, K.L., Fink, A.L., *hsp70-protein complexes. Complex stability and conformation of bound substrate protein.* J Biol Chem. **269**(18): p. 13107-14(1994).

71. Tanaka, N., Nakao, S., Wadai, H., Ikeda, S., Chatellier, J., Kunugi, S., *The substrate binding domain of DnaK facilitates slow protein refolding*. Proc Natl Acad Sci U S A. **99**(24): p. 15398-403(2002).
72. Redfield, C., Schulman, B.A., Milhollen, M.A., Kim, P.S., Dobson, C.M., *Alpha-lactalbumin forms a compact molten globule in the absence of disulfide bonds*. Nat Struct Biol. **6**(10): p. 948-52(1999).
73. Kuwajima, K., *The molten globule state of alpha-lactalbumin*. Faseb J. **10**(1): p. 102-9(1996).
74. Bosl, B., Grimminger, V., Walter, S., *Substrate binding to the molecular chaperone Hsp104 and its regulation by nucleotides*. J Biol Chem. **280**(46): p. 38170-6(2005).
75. Hayer-Hartl, M.K., Ewbank, J.J., Creighton, T.E., Hartl, F.U., *Conformational specificity of the chaperonin GroEL for the compact folding intermediates of alpha-lactalbumin*. Embo J. **13**(13): p. 3192-202(1994).
76. Palleros, D.R., Reid, K.L., McCarty, J.S., Walker, G.C., Fink, A.L., *DnaK, hsp73, and their molten globules. Two different ways heat shock proteins respond to heat*. J Biol Chem. **267**(8): p. 5279-85(1992).
77. Wawrzynow, A., Banecki, B., Wall, D., Liberek, K., Georgopoulos, C., Zylicz, M., *ATP hydrolysis is required for the DnaJ-dependent activation of DnaK chaperone for binding to both native and denatured protein substrates*. J Biol Chem. **270**(33): p. 19307-11(1995).
78. Sha, B., Lee, S., Cyr, D.M., *The crystal structure of the peptide-binding fragment from the yeast Hsp40 protein Sis1*. Structure. **8**(8): p. 799-807(2000).
79. Cajo, G.C., Horne, B.E., Kelley, W.L., Schwager, F., Georgopoulos, C., Genevaux, P., *The role of the DIF motif of the DnaJ (Hsp40) co-chaperone in the regulation of the DnaK (Hsp70) chaperone cycle*. J Biol Chem. **281**(18): p. 12436-44(2006).

80. Rothman, J.E., *Polypeptide chain binding proteins: catalysts of protein folding and related processes in cells*. Cell. **59**(4): p. 591-601(1989).
81. Kreuzer, K.N., Jongeneel, C.V., *Escherichia coli phage T4 topoisomerase*. Methods Enzymol. **100**: p. 144-60(1983).
82. Fernandez-Saiz, V., Moro, F., Arizmendi, J.M., Acebron, S.P., Muga, A., *Ionic contacts at DnaK substrate binding domain involved in the allosteric regulation of lid dynamics*. J Biol Chem. **281**(11): p. 7479-88(2006).
83. Montgomery, D., Jordan, R., McMacken, R., Freire, E., *Thermodynamic and structural analysis of the folding/unfolding transitions of the Escherichia coli molecular chaperone DnaK*. J Mol Biol. **232**(2): p. 680-92(1993).
84. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem. **72**: p. 248-54(1976).
85. Compton, S.J., Jones, C.G., *Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay*. Anal Biochem. **151**(2): p. 369-74(1985).
86. Stevens, S.Y., Cai, S., Pellecchia, M., Zuiderweg, E.R., *The solution structure of the bacterial HSP70 chaperone protein domain DnaK(393-507) in complex with the peptide NRLLLTG*. Protein Sci. **12**(11): p. 2588-96(2003).
87. Vogel, M., Bukau, B., Mayer, M.P., *Allosteric regulation of Hsp70 chaperones by a proline switch*. Mol Cell. **21**(3): p. 359-67(2006).
88. Benaroudj, N., Triniolles, F., Ladjimi, M.M., *Effect of nucleotides, peptides, and unfolded proteins on the self-association of the molecular chaperone HSC70*. J Biol Chem. **271**(31): p. 18471-6(1996).
89. Ohno, M., Kitabatake, N., Tani, F., *Role of the C-terminal region of mouse inducible Hsp72 in the recognition of peptide substrate for chaperone activity*. FEBS Lett. **576**(3): p. 381-6(2004).

90. Feifel, B., Sandmeier, E., Schonfeld, H.J., Christen, P., *Potassium ions and the molecular-chaperone activity of DnaK*. Eur J Biochem. **237**(1): p. 318-21(1996).
91. Rohde, M., Dugaard, M., Jensen, M.H., Helin, K., Nylandsted, J., Jaattela, M., *Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms*. Genes Dev. **19**(5): p. 570-82(2005).
92. Tutar, Y., Song, Y., Masison, D.C., *Primate chaperones Hsc70 (constitutive) and Hsp70 (induced) differ functionally in supporting growth and prion propagation in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics. **172**(2): p. 851-61(2006).
93. Grimshaw, J.P., Siegenthaler, R.K., Zuger, S., Schonfeld, H.J., Z'Graggen B, R., Christen, P., *The heat-sensitive Escherichia coli grpE280 phenotype: impaired interaction of GrpE(G122D) with DnaK*. J Mol Biol. **353**(4): p. 888-96(2005).
94. Tsai, J., Douglas, M.G., *A conserved HPD sequence of the J-domain is necessary for YDJ1 stimulation of Hsp70 ATPase activity at a site distinct from substrate binding*. J Biol Chem. **271**(16): p. 9347-54(1996).
95. Murai, N., Taguchi, H., Yoshida, M., *Kinetic analysis of interactions between GroEL and reduced alpha-lactalbumin. Effect of GroES and nucleotides*. J Biol Chem. **270**(34): p. 19957-63(1995).
96. Farr, C.D., Witt, S.N., *Kinetic evidence for peptide-induced oligomerization of the molecular chaperone DnaK at heat shock temperatures*. Biochemistry. **36**(35): p. 10793-800(1997).
97. Shi, L., Kataoka, M., Fink, A.L., *Conformational characterization of DnaK and its complexes by small-angle X-ray scattering*. Biochemistry. **35**(10): p. 3297-308(1996).
98. Hubbard, T.J., Sander, C., *The role of heat-shock and chaperone proteins in protein folding: possible molecular mechanisms*. Protein Eng. **4**(7): p. 711-7(1991).

99. Rothman, J.E., Kornberg, R.D., *Cell biology. An unfolding story of protein translocation*. Nature. **322**(6076): p. 209-10(1986).